

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"



DOTTORATO DI RICERCA

IN

BIOLOGIA AVANZATA

Indirizzo: Biologia Evolutiva

XXV CICLO

***I meccanismi molecolari che regolano la risposta allo
stress in embrioni di vertebrati non mammiferi***

Relatore

Ch.mo Prof. Luciano Gaudio

Correlatore

Dott.ssa Scudiero Rosaria

Candidato

Dott.ssa Esposito Maria Grazia

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Luciano Gaudio

Anno accademico 2012/2013

Indice

SINOSSI

1

L'EMBRIOGENESI

1	La riproduzione	3
1.1	La riproduzione nei Vertebrati	4
1.2	Le fasi dell'Embriogenesi	8
✓ 1.2.1	La segmentazione	9
✓ 1.2.2	La gastrulazione	10
✓ 1.2.3	L'organogenesi	13
1.3	Controllo genetico dello sviluppo embrionale	15
✓ 1.3.1	I geni materni	15
✓ 1.3.2	I geni master	16
✓ 1.3.2	I geni esecutori	20

STRESS AMBIENTALI & ALTERAZIONE DELL'EMBRIOGENESI

2	Stress e sviluppo embrionale	17
✓ 2.1	Stress ambientali di natura fisica: Variazioni di temperatura	18
✓ 2.1.1	Effetti biologici dell'aumento di temperatura	19
✓ 2.1.2	Effetti biologici dell'abbassamento della temperatura	20
2.2	Stress ambientali di natura chimica: i metalli pesanti	20
✓ 2.2.1	Effetti biologici dei metalli pesanti tossici	24
✓ 2.2.2	Il cadmio	26
✓ 2.2.3	Effetti teratogeni del cadmio	30
2.3	Proteine a funzione citoprotettiva	32
✓ 2.3.1	Le metallotioneine (MT)	32
✓ 2.3.2	Le Heat Shock Proteins (HSPs)	34

ORGANISMI MODELLO & TERATOGENESI COMPARATA

3	Anatomia comparata ed evoluzione	39
3.1	Gli organismi modello	40
3.2	Teratogenesi comparata	42

SCOPO DELLA RICERCA & SISTEMI BIOLOGICI

4	Scopo della ricerca	45
4.1	I° Sistema Biologico: <i>Danio rerio</i>	45
✓ 4.1.1	Gli Ittiopsidi	45
✓ 4.1.2	<i>Danio rerio</i>	47
✓ 4.1.3	Sviluppo embrionale di <i>Danio rerio</i>	48
4.2	II° Sistema Biologico: <i>Podarcis sicula</i>	50
✓ 4.2.1	I rettili	50
✓ 4.2.2	<i>Podarcis sicula</i>	52
✓ 4.2.3	Sviluppo embrionale di <i>Podarcis sicula</i>	55

MATERIALI & METODI

5.1	Trattamento di <i>Danio rerio</i>	57
✓ 5.1.1	Incubazione con CdCl ₂	57
✓ 5.1.2	Incubazione a freddo	57
5.2	Trattamento di <i>Podarcis sicula</i>	58
✓ 5.2.1	Incubazione con CdCl ₂	58
✓ 5.2.2	Incubazione a freddo	58
5.3	Analisi morfologica	59
✓ 5.3.1	Preparazione dei campioni per la microscopia ottica	59
✓ 5.3.2	Colorazione con emallume-eosina	59
✓ 5.3.3	Ibridazione <i>in situ</i>	60
✓ 5.3.4	Acquisizione delle immagini ed elaborazione delle tavole	61
5.4	Analisi Biomolecolare	61
✓ 5.4.1	Preparazione ed estrazione dell'RNA totale	61
✓ 5.4.2	Trattamento con DNasiI dell'RNA totale	61
✓ 5.4.3	Elettroforesi su gel d'agarosio	61
✓ 5.4.4	Analisi di mRNA <i>Differential Display</i> (DDRT-PCR)	62
✓ 5.4.5	Clonaggio dei frammenti di cDNA	66
✓ 5.4.6	Sequenziamento dei frammenti di cDNA	67
✓ 5.4.7	Analisi delle sequenze nucleotidiche	67

RISULTATI I^A PARTE: ANALISI DEGLI EFFETTI DELLO STRESS SUGLI EMBRIONI

6.1	<i>Danio rerio</i>	69
✓ 6.1.1	Effetti dello stress a livello morfologico	69

✓ 6.1.2	Effetti dello stress a livello molecolare	69
6.2	<i>Podarcis sicula</i>	79
✓ 6.2.1	Effetti dello stress a livello morfologico	79
✓ 6.2.2	Effetti dello stress a livello molecolare	86

RISULTATI II^A PARTE: ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI GENI CONNESSI ALLO

STRESS E ALL'EMBRIOGENESI

7.1	Proteine a funzione citoprotettiva in <i>Danio rerio</i>	89
✓ 7.1.1	Localizzazione dell'RBBP6-mRNA	89
✓ 7.1.2	Localizzazione di Cryl1-mRNA	93
7.2	Localizzazione di proteine a funzione citoprotettiva in <i>Podarcis sicula</i>	97
✓ 7.2.1	Localizzazione dell'MT-mRNA	97
✓ 7.2.2	Localizzazione dell'HSP70-mRNA	101

DISCUSSIONI

8	Teratogenesi sperimentale	106
8.1	Evidenze morfologiche in <i>Danio rerio</i>	106
8.2	Evidenze morfologiche in <i>Podarcis sicula</i>	107
8.3	Evidenze molecolari in <i>Danio rerio</i>	108
✓ 8.3.1	Azione del cadmio sull'espressione genica	108
✓ 8.3.2	Azione del freddo sull'espressione genica	110
✓ 8.3.3	Localizzazione molecolare <i>in situ</i>	112
8.4	Evidenze molecolari in <i>Podarcis sicula</i>	114
✓ 8.4.1	Azione del cadmio sull'espressione genica	114
✓ 8.4.2	Azione del freddo sull'espressione genica	115
✓ 8.4.3	Localizzazione molecolare <i>in situ</i>	116
8.5	Conclusioni	118

Bibliografia





Sinossi

L'ontogenesi, o sviluppo embrionale, è un processo estremamente complesso che inizia con la fusione di due cellule aploidi, i gameti, e termina con la nascita. La cellula uovo fecondata, lo zigote, segue un pattern di sviluppo programmato che avviene sotto lo stretto controllo del patrimonio genetico e che gli consente di acquisire gradualmente l'organizzazione, anatomica e strutturale, tipica della sua specie. L'embriogenesi risulta essere quindi, un processo finemente regolato a livello spazio-temporale attraverso un minuzioso network di regolazione inter- e intra-cellulare. La proliferazione ed il differenziamento delle cellule, che originano dallo zigote, richiedono l'attivazione/disattivazione ordinata e coordinata di numerosi geni specifici, che condurranno la loro progenie cellulare a disporsi secondo un preciso ordine anatomico a formare le strutture del futuro individuo. È stato dimostrato che, il controllo della proliferazione e del differenziamento avviene in fasi molto precoci dello sviluppo e in alcune specie, come gli Insetti, addirittura nell'ovocita (Patel 1994). E' noto che, nei Vertebrati gran parte del patrimonio genomico cellulare è attivo durante l'embriogenesi, ma resta da chiarire come l'organismo riesca a regolare la funzione di un gran numero di geni in un complesso quadro di interazioni molecolari e cellulari. Affinché vi sia una corretta progressione dello sviluppo è necessario che ad ogni singolo stadio dell'embriogenesi – segmentazione, gastrulazione ed organogenesi – vi siano le opportune condizioni chimico-fisiche che ne permettano la progressione allo stadio successivo. Negli ultimi anni per comprendere i meccanismi alla base di specifici processi cellulari embrionali si è diffuso sempre più l'utilizzo di agenti teratogeni che perturbano l'equilibrio cellulare alterando il fisiologico funzionamento della cellula stessa. L'embrione sottoposto a questi agenti "stressori" esogeni, a livello fenotipico, mostra alterazioni morfologiche. La *teratogenesi sperimentale* basandosi esclusivamente su aspetti morfologici ha avuto, fino ad oggi, un ruolo fondamentale nello screening dei potenziali teratogeni e degli agenti chimico-fisici. Recentemente, anche grazie alla continua evoluzione delle tecniche di genetica e biologia molecolare, l'attenzione si è focalizzata sui meccanismi d'azione che conducono alla genesi di tali malformazioni. E' stata sviluppata una sorta di "*ontogenesi funzionale*" attraverso la quale partendo dall'osservazione del fenotipo, risultante da uno specifico trattamento a cui si sottopone l'embrione, si giunge a rivelare i processi chiave che ne determinano l'insorgenza. La possibilità di disporre di organismi modello appartenenti a specie differenti tra loro, ha

consentito di effettuare analisi comparative e di comprendere quindi, quali stress determinano la stessa risposta negli embrioni di tutte le specie analizzate e quali invece inducono risposte specie-specifiche. E' noto che, i geni che regolano le fasi precoci dell'embriogenesi sono molto conservati nell'ambito di un Phylum, facendo quindi presumere una comparabile conservazione anche dei meccanismi che determinano la teratogenesi per specifici tipi di stress. Se geni comuni regolano lo sviluppo di embrioni appartenenti a classi diverse di vertebrati, potrebbe risultare interessante una *teratologia comparata*, basata sul confronto delle alterazioni del pattern di espressione genica indotte da fattori ambientali e delle loro manifestazioni fenotipiche in differenti classi di Vertebrati. In questo lavoro di tesi si è cercato di definire il profilo molecolare dei geni associati alle alterazioni morfologiche indotte da stress durante lo sviluppo embrionale di Vertebrati non Mammiferi. A tale scopo è stato condotto uno studio comparato tra due sistemi biologici: l'ittiopside *Danio rerio* e il Tetrapode oviparo *Podarcis sicula*. Questi organismi sono collegati da un punto di vista filogenetico, quindi è plausibile che utilizzino le stesse vie metaboliche e gli stessi *pathway* molecolari per espletare le medesime funzioni cellulari; al contempo essendo un organismo acquatico l'uno e terrestre l'altro è implicito che abbiano evoluto differenti meccanismi adattativi, atti alla sopravvivenza ed alla riproduzione. Nel corso degli esperimenti, gli embrioni di entrambi gli organismi sono stati esposti a due tipi di stress: uno shock termico (repentino abbassamento della temperatura), ed uno chimico, (contaminazione con cadmio) per poi essere sottoposti ad analisi morfologiche e molecolari. I risultati ottenuti hanno sottolineato un interessante parallelo tra le risposte biologiche allo stress nei due sistemi sperimentali analizzati. In particolare dal punto di vista morfologico si è dimostrato che i diversi agenti teratogeni studiati inducono alterazioni simili a carico delle vescicole encefaliche e dell'occhio sia in tetrapodi ovipari che in teleostei, dimostrando che queste strutture, indipendentemente dal mezzo in cui avviene lo sviluppo, sono particolarmente sensibili all'effetto di stimoli stressori di differente natura. Le indagini molecolari, invece, condotte attraverso saggi di espressione genica differenziale, hanno evidenziato che gli effetti teratogeni del cadmio e delle basse temperature sembrano manifestarsi *direttamente*, modificando l'equilibrio elettrochimico della membrana e agendo su fattori trascrizionali correlati a geni strettamente legati allo sviluppo embrionale ed *indirettamente*, causando una serie di meccanismi a catena che regolano attività cellulari e geni fondamentali dell'embriogenesi.

Capitolo 1

L'embriogenesi

-  La riproduzione
-  La riproduzione nei vertebrati
-  Le fasi dell'embriogenesi
 - La segmentazione
 - La gastrulazione
 - L'organogenesi
-  Controllo genico dello sviluppo embrionale
 - I geni materni
 - I geni master
 - I geni esecutori

1 La riproduzione

Una prerogativa degli esseri viventi è rappresentata dalla loro capacità di riprodursi e trasmettere di generazione in generazione le caratteristiche tipiche della specie. La sopravvivenza di ogni specie richiede in pratica che i suoi membri producano nuovi individui in grado di sostituire quelli che continuamente muoiono. A livello molecolare, la riproduzione si basa sulla capacità degli acidi nucleici di autoduplicarsi.

In natura la riproduzione può essere di due tipi: asessuata e sessuata.

La riproduzione asessuata è un processo nel quale non intervengono delle cellule sessualmente specializzate (i gameti). E' molto frequente nelle piante e perciò viene detta anche riproduzione vegetativa. La riproduzione asessuata è basata sulla mitosi, che produce copie delle cellule originali. Pertanto, la prole generata per via asessuata risulta geneticamente identica ai genitori ed è quindi costituita da cloni. Tale riproduzione permette agli organismi isolati o che vivono fissati a un substrato di riprodursi senza dover incontrare un altro organismo della stessa specie. La riproduzione asessuata si verifica quando una parte dell'organismo si distacca per dare origine a un nuovo organismo indipendente. Questo può avvenire in tre modi differenti.

1. La riproduzione per scissione si ha quando un organismo si divide e origina due o più parti di dimensioni simili. La scissione è tipica di molti organismi unicellulari e di diversi invertebrati acquatici come gli cnidari (per esempio gli anemoni di mare).
2. Nella gemmazione, invece, il nuovo individuo si sviluppa sul corpo del genitore e si stacca solo dopo essersi completamente formato. La gemmazione è tipica degli organismi unicellulari quali alghe, protozoi e lieviti.
3. La frammentazione avviene qualora un individuo si divida in numerose parti ciascuna delle quali dà origine ad un nuovo organismo. Questo tipo di riproduzione è caratteristico di alcuni gruppi di animali dotati di notevoli capacità di rigenerazione, come i poriferi e gli echinodermi.

Un vantaggio della riproduzione asessuata è rappresentato dal fatto che, attraverso il processo di mitosi, è possibile riprodurre il patrimonio genetico con rapidità e precisione. Ciò permette di generare un gran numero di nuovi individui con un notevole risparmio di tempo ed energia rispetto alla riproduzione sessuata. Il principale svantaggio della riproduzione asessuata è rappresentato dal fatto che essa origina popolazioni costituite da individui geneticamente uniformi. Una popolazione con queste caratteristiche potrebbe, in caso di cambiamenti ambientali sfavorevoli, presentare delle

difficoltà a sopravvivere e a riprodursi e quindi rischiare l'estinzione. La riproduzione sessuata, invece, consiste nella produzione di prole tramite la fecondazione, cioè l'unione di due cellule sessuali: i gameti. Questi hanno un patrimonio genetico aploide. Il numero dei loro cromosomi (n) è la metà di quello caratteristico della specie, perché per ciascuna coppia ne è presente soltanto uno. Il gamete maschile è lo spermatozoo, una cellula piccola ma molto mobile. Il gamete femminile è la cellula uovo (o oocita), una cellula di solito grande e incapace di muoversi. La fecondazione può avvenire sia esternamente sia internamente al corpo della femmina e produce una cellula, lo zigote, con patrimonio genetico diploide ($2n$).

1.1 La Riproduzione nei Vertebrati

In campo animale la riproduzione sessuale implica la produzione e la fusione reciproca di due diversi tipi di gameti, spermatozoi e cellule uovo. Questo tipo di riproduzione è caratteristico dei Vertebrati e presenta il vantaggio di promuovere la varietà genetica fra vari membri di una specie, poiché la prole è il prodotto di una particolare combinazione di geni forniti dai due genitori, anziché la copia genetica di un singolo individuo. La riproduzione implica la formazione di cellule specializzate, i gameti maschili e femminili, che unendosi danno origine ad un'unica cellula, lo zigote, che si sviluppa in un nuovo individuo. I gameti vengono prodotti negli organi sessuali primari, ovvero, la gonade maschile o testicolo e la gonade femminile o ovario. I gameti maschili, gli spermatozoi, sono piccoli e mobili grazie alla presenza del flagello; i gameti femminili, le cellule uovo, hanno, invece, dimensioni maggiori e sono immobili. Un fattore indispensabile per l'incontro tra uovo e spermatozoo è la presenza di un ambiente acquoso, nel quale lo spermatozoo possa muoversi e raggiungere la cellula uovo. Nel corso dell'evoluzione, i Vertebrati hanno sviluppato, in relazione al proprio habitat, due principali strategie riproduttive che garantiscono l'incontro tra i gameti: la fecondazione esterna e quella interna. Nella fecondazione esterna, la femmina rilascia le uova nell'ambiente ed il maschio le feconda; in quella interna invece il maschio introduce i propri gameti, direttamente, nell'apparato riproduttivo femminile. Tra i Vertebrati, la fecondazione esterna è tipica di Pesci ed Anfibi (Gilbert 2010).

Nei pesci, la fecondazione richiede la produzione di un gran numero di gameti, da parte di entrambi i partner, per aumentare la probabilità di incontro, che altrimenti risulterebbe essere esigua. In molte specie di pesci, infatti, la femmina libera le uova nell'ambiente circostante e il maschio le feconda, spargendo il proprio liquido seminale

in acqua o direttamente sulle uova deposte. Inoltre, è indispensabile che i maschi e le femmine della stessa specie si riconoscano e si trovino alla giusta distanza al momento della deposizione dei gameti.



Figura 1.1: Pesci in fase di deposizione dei gameti

Negli Anfibi, primi vertebrati a colonizzare le terre emerse, si sono affermati adattamenti riproduttivi in grado di ovviare al rischio di disseccamento al quale gli spermatozoi sarebbero altrimenti esposti. Così, la maggior parte delle specie, pur vivendo sulla terraferma, ritorna all'acqua durante la stagione riproduttiva. Per ottimizzare l'incontro dei gameti, in rane e rospi, il maschio cinge la femmina, in vicinanza dell'acqua, e ne feconda le uova man mano che vengono emesse sotto forma di un lungo nastro gelatinoso. Alcune specie di Anfibi Anuri depongono, fuori dall'acqua, uova riunite in masse e avvolte da membrane gelatinose che creano l'ambiente idoneo alla fecondazione (Figura 1.2)

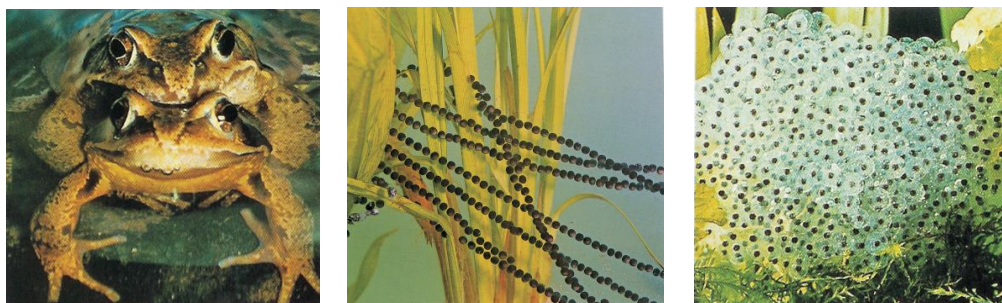


Figura 1.2: Anfibi in accoppiamento (a sinistra), nastro gelatinoso di uova (al centro), uova riunite in massa (a destra).

Rettili, Uccelli e Mammiferi si riproducono in ambiente terrestre senza alcun problema, grazie alla fecondazione interna, resa possibile dalla presenza, nei maschi, di un organo copulatore, che trasferisce gli spermatozoi nell'apparato riproduttivo femminile.

Rettili ed Uccelli, inoltre, depongono uova provviste di gusci resistenti alle offese meccaniche ed alla disidratazione ed in grado, quindi, di tollerare ambienti anche sfavorevoli. Nei Mammiferi, invece, l'embrione si sviluppa all'interno del corpo materno.



Figura 1.3: Uova di uccelli con guscio calcareo (a sinistra), uova di rettili con guscio calcareo (al centro), embrione umano di sei settimane (a destra).

La capacità di sviluppo di Mammiferi e Sauropsidi - Rettili ed Uccelli - in un ambiente privo di acqua è conferita loro dagli annessi embrionali, Amnios, Corion, Sacco vitellino ed Allantoide. Queste membrane, di natura extraembrionale, sono atte a creare condizioni favorevoli di sviluppo in un ambiente terrestre e mediano i rapporti embrionali con l'esterno.

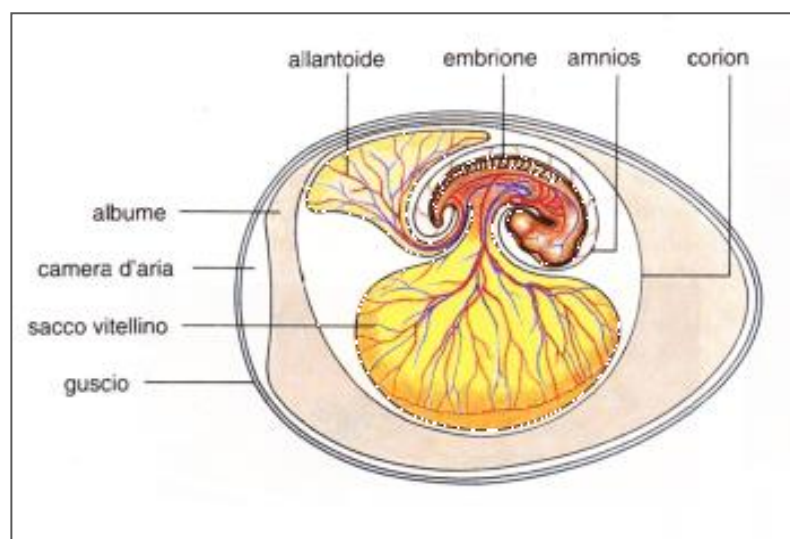


Figura 1.4: Organizzazione strutturale dell'uovo amniotico. Le sue membrane

- L'*amnios* ha la funzione di proteggere le cellule embrionali dall'essiccamento, le cellule di questa membrana secernono liquido amniotico, che costituisce il mezzo acquoso nel quale avviene l'embriogenesi. L'amniogenesi è un adattamento evolutivo talmente significativo e caratteristico che Rettili Uccelli e Mammiferi sono classificati come Amnioti.
- Il *corion* è la più esterna delle membrane extraembrionali, provvede agli scambi gassosi tra l'embrione e l'ambiente esterno. Nei Rettili e negli Uccelli essa aderisce al guscio, mentre, nei Mammiferi si è evoluto nella placenta coriale sviluppando funzioni endocrine, immunitarie e nutritive oltre che respiratorie.
- L'*allantoide* accumula i prodotti di rifiuto urinari e prende parte agli scambi respiratori. Nei Sauropsidi, essendo l'unico sistema di smaltimento dei cataboliti tossici embrionali, si sviluppa notevolmente dando origine ad un ampio sacco. Nei Mammiferi le dimensioni dell'Allantoide dipendono dall'efficienza della placenta coriale nella rimozione dei rifiuti azotati, nell'uomo ad esempio, data l'elevata efficienza del circolo materno nel rimuovere i cataboliti, è un sacco vestigiale.
- Il *sacco vitellino* è la prima membrana extraembrionale che si forma. Svolge un'azione trofica, in quanto i vasi sanguigni che in essa si formano trasportano le sostanze nutritive dalla cellula del vitello all'embrione.

In questo modo le quattro membrane extraembrionali permettono all'embrione degli Amnioti di svilupparsi sulla terraferma. Il successo riproduttivo della specie dipende da peculiari adattamenti in grado di favorire lo sviluppo dell'embrione. I Vertebrati hanno evoluto tre diverse strategie per la cura e la tutela dell'embrione: oviparità, ovoviparità e viviparità. I Vertebrati Ovipari (Pesci, Anfibi, Rettili, Uccelli, e Mammiferi Monotremi) depongono le uova nell'ambiente esterno e gli embrioni si sviluppano all'esterno del corpo materno. In pesci ed Anfibi, l'embrione si sviluppa molto rapidamente, trasformandosi precocemente in larva capace di nutrirsi autonomamente. Le uova, pertanto, sono piccole e accumulano scarso nutrimento per l'embrione. In Rettili ed Uccelli, invece, l'embrione si sviluppa molto lentamente in un giovane individuo, in molti casi senza passare per lo stadio larvale. In questi organismi, l'uovo è di notevoli dimensioni, in quanto immagazzina grandi quantità di sostanze di riserva, nutrimento per il futuro embrione.

I Vertebrati Ovovivipari trattengono le uova fecondate nel corpo materno e gli embrioni si nutrono delle riserve contenute nell'uovo. Il corpo della madre ha, quindi, solo

funzione protettiva per l'embrione. Al termine dello sviluppo le madri "partoriscono" piccoli completamente formati e non uova.

Nei vertebrati Vivipari, l'uovo fecondato si impianta *in utero*, e da esso riceve il nutrimento necessario per lo sviluppo. Gli organismi vivipari più specializzati sono i Mammiferi; tra essi, nei Marsupiali la capacità del corpo materno di fornire nutrimento all'embrione è ancora piuttosto limitata: gli embrioni restano per un breve periodo nelle vie genitali femminili ed i piccoli vengono partoriti precocemente, completando lo sviluppo nel marsupio, una tasca situata sul ventre della madre, dove si nutrono del latte secreto da ghiandole mammarie. Nei Mammiferi Placentati, gli embrioni si sviluppano completamente nell'utero, ricavando il nutrimento dall'apporto di sangue che la madre garantisce loro tramite un organo specializzato, la placenta (Gilbert 2010).

1.2 Le Fasi dell'Embriogenesi

Ogni animale passa attraverso stadi di sviluppo simili. La vita di un nuovo individuo, fatta eccezione per i casi di partenogenesi, inizia con l'unione del materiale genetico dei due gameti, quest'unione - la fecondazione - stimola l'uovo a iniziare lo sviluppo (West, Brown et al. 2001). La fecondazione quindi, nella maggior parte dei casi, è l'evento che mette in moto in modo irreversibile il processo di formazione di un nuovo individuo, dando origine ad una discendenza mediante la riproduzione sessuata. Gli stadi dello sviluppo compresi tra la fecondazione e la nascita costituiscono nell'insieme l'embriogenesi. Questa è classicamente suddivisa in tre fasi successive - in realtà risultano essere parzialmente sovrapposte da un punto di vista spazio-temporale - che seguono la fecondazione: la segmentazione, la gastrulazione e l'organogenesi (West, Brown et al. 1997). Lo sviluppo post-embrionale è, per molte specie, il periodo successivo al momento della nascita; e può avvenire sia in *modo diretto* che *indiretto*: nel primo caso il giovane organismo raggiunge progressivamente lo stadio adulto attraverso un processo di accrescimento, mentre nel secondo caso va incontro ad un periodo critico, *la metamorfosi*, che assicura il passaggio dallo stadio larvale a quello adulto. Queste regole generali dello sviluppo tuttavia possono presentare numerose variazioni a seconda dei *Taxa* e delle specie considerate. Nei Mammiferi Placentati, ad esempio, si possono distinguere delle ulteriori fasi di sviluppo *in utero*, con una fase embrionale propriamente detta, a cui segue una fase di sviluppo fetale, caratterizzata soprattutto da fenomeni di accrescimento delle strutture formatesi nella fase precedente.

○ 1.2.1 La Segmentazione

Dopo la fecondazione, lo sviluppo dell'organismo pluricellulare progredisce mediante il processo di *segmentazione*, una serie di divisioni mitotiche attraverso le quali l'enorme volume del citoplasma ovulare è suddiviso in numerose cellule nucleate più piccole, dette *blastomeri*. In questo stadio, l'embrione viene definito *blastula* e il suo volume non varia rispetto a quello dell'uovo fecondato. La divisione del citoplasma senza aumento del volume è conseguenza del *ciclo bifasico della mitosi*, caratteristico dei primi blastomeri, nel quale manca il periodo di accrescimento tra una divisione cellulare e l'altra (fasi G1 e G2 del ciclo cellulare). Così come la transizione dalla fecondazione alla segmentazione, il ciclo bifasico della mitosi è regolato dal fattore di promozione della mitosi (MPF).

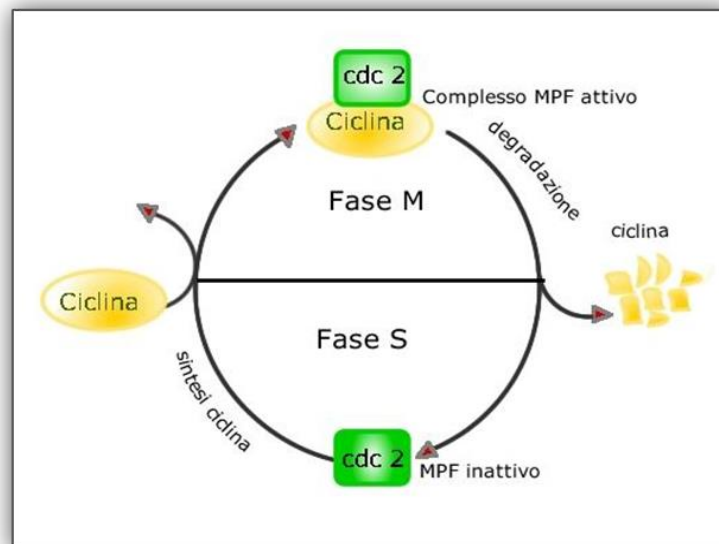


Figura 1.5: Ciclo cellulare bifasico dei primi blastomeri

Infatti, la fase di sintesi (S) e quella di mitosi (M) del ciclo cellulare sono guidate esclusivamente dall'acquisizione e dalla perdita di attività dell'MPF (Newport and Kirschner 1982). Quest'ultimo è composto da due subunità: quella maggiore, la Ciclina B, ha attività catalitica ed è la componente che mostra un andamento ciclico, accumulandosi nella fase S e venendo poi degradata dopo che le cellule sono entrate nella fase M (Evans, Rosenthal et al. 1983; Swenson, Farrell et al. 1986); quella minore ad attività chinasi, la Cdc2, è sempre presente ma risulta attiva solo in presenza della Ciclina B. Il legame della Cdc2 alla *cycB* è necessario, ma non sufficiente per l'attività chinasi. Infatti, l'attività dell'MPF è regolata attraverso meccanismi di

fosforilazione/defosforilazione della subunità catalitica. La ciclina B viene sintetizzata e degradata da proteine accumulate precedentemente nel citoplasma della cellula uovo. Nella maggior parte delle specie, eccezion fatta per i Mammiferi, nelle prime fasi della segmentazione il genoma zigotico è silente. Molti dei componenti necessari per il corretto funzionamento delle cellule sono già stati accumulati durante la maturazione della cellula uovo, il ciclo cellulare è dunque indipendente dal genoma nucleare, zigotico, per numerosi cicli di divisione, che risultano essere veloci e sincroni. Tuttavia, quando le componenti citoplasmatiche si esauriscono, il nucleo inizia a sintetizzarle. In questa fase, definita *transizione della blastula intermedia (MBT)*, si ha la progressiva attivazione del genoma zigotico e un concomitante rallentamento della velocità della divisione nucleare. Nella fase di blastula intermedia si verificano numerosi fenomeni tra i quali:

- Accrescimento cellulare, derivante dall'inserimento delle fasi Gap (G1 e G2) nel ciclo cellulare.
- Perdita della sincronia delle divisioni cellulari, poiché nelle cellule è ora attivo il genoma zigotico che controlla la sintesi dei regolatori dell'MPF, e cellule differenti sintetizzano regolatori differenti.
- Inizia la trascrizione di nuovi mRNA, molti dei quali serviranno per la gastrulazione.

Esistono diverse tipologie di segmentazione embrionale, che dipendono dalla quantità e distribuzione del vitello nel citoplasma e da fattori presenti nel citoplasma dell'uovo. Questi ultimi influiscono sull'orientamento del fuso mitotico al momento della sua formazione determinando il tipo di simmetria: radiale, spirale, rotazionale o bilaterale. La quantità e la distribuzione del vitello determinano la sede in cui può avvenire la segmentazione e le dimensioni relative dei blastomeri, le placchette di vitello, infatti, rappresentano un impedimento alla formazione del solco di segmentazione. La quantità di vitello - costituito principalmente da carboidrati, lipidi e glicoproteine - tende ad essere accumulato principalmente al polo vegetativo. In un embrione possiamo individuare due poli, infatti, e quello animale costituito da una piccola percentuale di vitello e dalla presenza del nucleo, nel quale le divisioni cellulari che si susseguono ad un ritmo molto più veloce di quelle del polo vegetativo, caratterizzato invece da una maggiore quantità di vitello.

Tipi di segmentazione:

- Una segmentazione *oloblastica* o totale, in cui il solco di segmentazione attraversa tutto il citoplasma, dal polo animale a quello vegetativo - tipica dei Mammiferi,

Echinodermi e Molluschi Gasteropodi - si osserva in cellule uovo che possiedono una quantità scarsa e uniformemente distribuita di vitello, tali uova sono definite *isolecitiche*.

- All'estremo opposto si trovano uova in cui il vitello occupa la maggior parte del volume citoplasmatico – tipiche degli Insetti, Pesci, Rettili e Uccelli - e impedisce al solco di divisione di penetrare nell'emisfero vegetativo; ne risulta una segmentazione *meroblastica* ovvero parziale. Se il vitello occupa la parte centrale dell'uovo (uova *centrolecitiche*) la segmentazione coinvolge solo la superficie dello zigote (*segmentazione meroblastica superficiale*), mentre quando il vitello occupa quasi interamente il citoplasma lasciando solo una piccola regione di uovo libera (uova *telolecitiche*) la segmentazione avviene esclusivamente in questo piccolo disco di citoplasma attuando un tipo di *segmentazione meroblastica discoidale*.
- Le uova *mesolecitiche* -tipiche degli Anfibi - sono caratterizzate da una discreta quantità di vitello, concentrata al polo vegetativo, insufficiente per bloccare il solco di divisione ma sufficiente per rallentarlo (Valles, Wasserman et al. 2002). In queste uova si osserva una *segmentazione oloblastica ineguale*.

Tipi di blastula

La segmentazione porta in ogni caso alla formazione di una blastula. Vari tipi di blastule possono essere così distinte:

- Celoblastula: tipica degli Echinodermi e degli Anfibi, presenta una cavità delimitata da uno strato cellulare epiteliale detta blastocele (o celoma primario) che può essere localizzata in posizione centrale (come nell'anfiosso) o in posizione eccentrica (come negli Anfibi). Si origina comunemente da segmentazione oloblastica.
- Discoblastula: tipica dei Pesci, dei Rettili e degli Uccelli, presenta la cavità subgerminale, formata superiormente da una disposizione monostratificata di blastomeri, la zona pellucida, e lateralmente da una zona più corposa, la zona opaca. Nella zona inferiore (come una sorta di pavimento) la cavità subgerminale è limitata da un sincizio di blastomeri che poggiano sull'abbondante tuorlo delle uova telolecitiche. La discoblastula si origina comunemente da segmentazione meroblastica.
- Periblastula: tipica degli Insetti e dei Crostacei, ha forma affusolata molto simile ad un'ellisse, si origina comunemente da segmentazione meroblastica superficiale.

- **Blastocisti:** tipica dei Mammiferi Placentati, è un tipo particolare di blastula in quanto formata da uno strato epiteliale che circonda la blastula detto trofoblasto ed internamente presenta un ammasso cellulare definito *massa cellulare interna* o *bottone embrionale*. Il trofoblasto ha significato esclusivamente extraembrionale, contribuisce all'impianto della blastocisti in utero. Il bottone embrionale, invece, ha significato prevalentemente embrionale.

○ 1.2.2 La Gastrulazione

La gastrulazione è una tappa di fondamentale importanza nella vita di un individuo, in quanto pone le basi per un'armonica organizzazione interna dell'organismo, basata sulla formazione di organi e tessuti determinati da un piano caratteristico di ogni specie. Mediante l'attuazione di *movimenti morfogenetici*, altamente coordinati, le cellule della blastula vengono drammaticamente ridistribuite assumendo nuove posizioni e nuove relazioni spaziali. Lo svolgimento di questa fase si manifesta con la progressiva formazione dei *foglietti embrionali*, che assumono una disposizione concentrica. In questo processo alcuni territori cellulari si spostano all'interno dell'embrione, occupando così lo spazio del blastocoele, nei casi in cui esso sia presente. In genere le cellule che si spostano all'interno dell'embrione formano una cavità in comunicazione con l'esterno, destinata a formare l'intestino primitivo, *l'Archenteron*. Nel periodo in cui avvengono questi movimenti l'embrione prende il nome di gastrula.

A seconda dei *Taxa*, durante la gastrulazione si possono formare due o tre foglietti embrionali:

- Gli organismi *Diblastici* - Poriferi, Cnidari e Ctenofori - posseggono solo due foglietti embrionali, l'ectoderma esterno e l'endoderma interno che delimita *l'Archenteron*.
- Negli organismi *Triblastici* si forma un terzo foglietto, il mesoderma, che si interpone tra endoderma ed ectoderma. Questo foglietto intermedio dà origine a numerosi tessuti ed organi che si localizzano tra le strutture di rivestimento, di origine ectodermica, e la massa viscerale dell'apparato digerente, di origine endodermica. Nei diversi *Taxa*, il mesoderma subisce notevoli trasformazioni che in alcuni casi portano alla formazione di una cavità, il *celoma*. Gli organismi triblastici celomati possono essere suddivisi in base alla struttura che formerà il blastoporo, l'apertura del blastoporo è l'orifizio che mette in comunicazione il lume dell' *Archenteron* con l'esterno. Nei Protostomi darà origine all'orifizio orale, e il celoma si forma per *schizocelia*, ovvero per cavitazione della massa mesodermica. Invece, nei

Deuterostomi il blastoporo darà origine all'orifizio aborale, e la cavità celomatica si origina per *enterocelia*, ovvero dalla fusione di vescicole che si formano nell'endomesoderma.

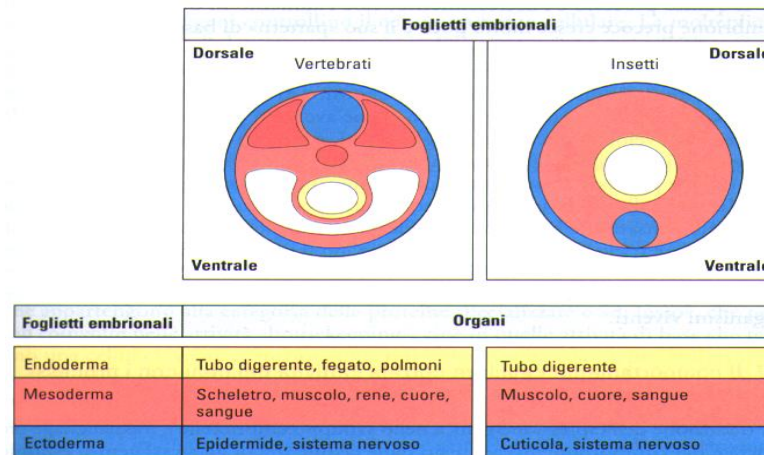


Figura 1.6: Schema della formazione dei foglietti embrionali e degli organi derivanti

Modalità di gastrulazione

La gastrulazione presenta notevoli variazioni in tutto il regno animale. Esistono soltanto pochi tipi fondamentali di movimenti morfogenetici, ciò che varia nei diversi tipi di gastrulazione è la combinazione dei seguenti movimenti:

- Invaginazione: ripiegamento all'interno di una regione di cellule.
- Embolia: introflessione con scorrimento all'interno di uno strato esterno in espansione, in modo tale da distribuirsi sulla superficie interna delle cellule rimaste all'esterno.
- Trasferimento all'interno: migrazione di singole cellule dallo strato superficiale all'interno dell'embrione. Le cellule si trasformano in cellule mesenchimali e migrano in modo indipendente.
- Delaminazione: divisione di una lamina cellulare in due o più lamine parallele.
- Epibolia: movimento di lamine di cellule ectodermiche, con attiva proliferazione, che si distendono a racchiudere gli strati interni dell'embrione.

○ 1.2.3 L'Organogenesi

I movimenti morfogenetici della gastrulazione portano alla formazione di territori embrionali distinti, seguendo una cronologia rigorosa e specifica per le diverse forme animali; successivamente compaiono nell'embrione dei tessuti differenti e sempre più

specializzati, le cui cellule interagiscono e cooperano formando organi atti a svolgere funzioni specifiche. Queste fasi dello sviluppo costituiscono nell'insieme l'organogenesi. La formazione di un organo, in genere, richiede la cooperazione di diversi elementi cellulari, alcuni dei quali sono deputati allo svolgimento delle funzioni specifiche di quell'organo, mentre altri svolgono funzioni trofiche o di sostegno. Ciò comporta che un organo pur formandosi prevalentemente da uno dei tre foglietti embrionali, per raggiungere la sua definitiva organizzazione può accogliere anche elementi derivanti da altri foglietti. Generalmente l'organogenesi inizia con la formazione del sistema nervoso, processo definito *neurulazione*, e l'embrione in questo stadio è detto neurula. Lo strato ectodermico dorsale, negli epineuri, si appiattisce e si ispessisce formando la piastra neurale delimitata dalle pieghe neurali, successivamente le pieghe neurali si avvicinano progressivamente, fino a fondersi l'una con l'altra lungo la linea medio-dorsale, per tutta la lunghezza dell'embrione, dando origine ad un tubo cavo definito *tubo neurale*. Le cellule dell'ectoderma che non partecipano alla formazione del tubo neurale lo ricoprono esternamente divenendo cellule epidermiche. Infine, le cellule neuroectodermiche situate ai lati della linea dorsale di chiusura del tubo neurale, durante la chiusura di quest'ultimo si separano. Queste sono le *cellule della cresta neurale*, che successivamente migreranno e daranno origine a numerosi derivati tissutali, come Sistema nervoso periferico, Midollare del surrene, Melanociti, Cartilagini della faccia, Dentina dei denti. Contemporaneamente si osserva una riorganizzazione delle strutture interne dell'embrione, il mesoderma forma la notocorda e inizia la somitogenesi. Lo stadio che segue la neurulazione è quello di *bottone caudale*, nel quale i cambiamenti morfologici più evidenti sono l'allungamento dell'embrione e la divisione del corpo in tre grandi regioni: cefalica, del tronco e caudale. Al contempo l'organizzazione interna si affina: si formano le vescicole cerebrali (prima 3, poi 5); ha inizio la formazione dei gangli simpatici a partire dalle cellule della cresta neurale; nei somiti si individuano il dermomiotomo e lo sclerotomo; il mesoderma delle lamine laterali si cava formando il celoma. Successivamente, nella regione antero-ventrale, si differenziano a partire dal mesoderma gli elementi dell'apparato circolatorio, e dorsalmente ai lati del mesentero dorsale le creste genitali si formano per ispessimento dell'epitelio celomatico. Al disopra delle creste genitali si forma il pronefro, dal quale si formerà la struttura renale dell'adulto. Durante l'organogenesi negli amnioti si formano anche gli annessi embrionali, strutture extraembrionali fondamentali per la sopravvivenza di questi organismi al di fuori di un ambiente acquatico. Negli Anfibi i

primi segni dell'organogenesi si manifestano al termine della gastrulazione, l'embriogenesi dunque progredisce in modo sequenziale. Nei Pesci, Rettili e Mammiferi, invece, non vi è una netta separazione temporale delle fasi dell'embriogenesi. Infatti, gli embrioni di queste specie mostrano un gradiente di sviluppo antero-posteriore, ovvero, mentre le cellule delle parti posteriori dell'embrione stanno attuando la gastrulazione, quelle dell'emisfero anteriore iniziano a formare organi.

1.3 Controllo genetico dello Sviluppo Embrionale

Lo sviluppo embrionale è un processo estremamente complesso che avviene sotto lo stretto controllo del patrimonio genetico. La proliferazione ed il differenziamento delle cellule embrionali sono sotto il controllo di numerosi geni specifici. È stato dimostrato che questo controllo inizia in fasi estremamente precoci, talvolta già nell'uovo. L'ovocita accumula molecole informative, mRNA, che saranno in parte utilizzate dall'ovocita stesso nel corso dell'ovogenesi e in parte trasferiti all'embrione che li utilizzerà soprattutto durante le fasi precoci dello sviluppo, quando le cellule sono attivamente impegnate nella duplicazione (Patel 1994). Durante l'ovogenesi e durante lo sviluppo embrionale si attivano geni che nel loro insieme regolano l'intero sviluppo dell'embrione: geni materni, geni "master" regolatori e geni esecutori. L'attività di questi geni è innescata in modo sequenziale ma, in alcuni casi, possono anche essere espressi contemporaneamente.

○ 1.3.1 I Geni Materni

I geni materni controllano il differenziamento iniziale e le prime fasi dell'organizzazione del corpo. È stato dimostrato che messaggeri destinati all'embrione sono accumulati nell'uovo in siti specifici con formazione di gradienti tipici. L'mRNA di *bicoid*, per esempio, è localizzato nella regione anteriore dell'uovo non fecondato ed è ancorato al citoscheletro (Berleth, Burri et al. 1988). Esso codifica per la proteina Bicoid, un fattore di trascrizione coinvolto nel differenziamento delle strutture cefaliche e toraciche dell'embrione di *Drosophila*. Quando l'embrione raggiunge lo stadio di blastoderma sinciziale, il gradiente antero-posteriore della proteina bicoid attiva l'espressione sequenziale di un importante gruppo di geni "gap" (Braat, van de Water et al. 2001). Inizialmente è attivato *hunchback*, il quale, a sua volta, accende i geni *pair-rule* e *segment polarity*. Questi geni determinano la formazione di segmenti, stabilendone il numero e la polarità, in *Drosophila*.

○ 1.3.2 Geni Master





Tra i geni regolatori, svolgono un ruolo fondamentale i geni selettori omeotici o *homeobox*. Questi geni sono espressi in diverse combinazioni lungo l'asse antero-posteriore, e hanno il ruolo di stabilire l'identità dei singoli segmenti. I geni HOX hanno un motivo molto conservato di circa 180 bp chiamato *homeobox* (McGinnis, Hart et al. 1984; Scott and Weiner 1984) che codifica per una regione lunga circa 60 aminoacidi, l'omeodominio, in grado di legare il DNA grazie alla presenza di un caratteristico motivo elica-ansa-elica (Lewin 2004). In base all'analisi filogenetica della sequenza dell'omeodominio e della struttura del dominio delle proteine, i geni *homeobox* sono stati classificati in 11 classi geniche (ANTP, PRD, LIM, POU, HNF, SINE, TALE, CUT, PROS, ZF e CERS) comprendenti in tutto 100 famiglie (Holland, Booth et al. 2007). Le diverse famiglie geniche controllano aspetti diversi dello sviluppo (Mukherjee, Brocchieri et al. 2009) mentre i geni di una stessa famiglia tendono ad avere funzioni collegate. Ad esempio, i geni della famiglia HOX, CDX, e EVX intervengono nell'embriogenesi precoce; le famiglie PAX6, SEI, VAX, EMX sono coinvolte nello sviluppo degli occhi, mentre le famiglie LIM e HMX in quello dei neuroni (Duboule 1992). Lo sviluppo di regioni complesse come, per esempio, il cervello è di solito sotto il controllo di più famiglie geniche che intervengono in maniera coordinata, spesso mostrando una espressione regione-specifica. Otx (Otx1, Otx2) ed Emx (Emx1, Emx2), per esempio, hanno un ruolo cruciale nel differenziamento dell'encefalo anteriore e del mesencefalo; i geni delle famiglie Dmbx1, Gbx, En e Pax-2/5/8 invece risultano organizzatori delle regioni del mesencefalo e dell'encefalo posteriore.

○ 1.3.3 I Geni Esecutori

I geni regolatori dello sviluppo hanno la fondamentale funzione di specificare il destino e organizzare le vari parti del corpo. Il loro lavoro si affianca necessariamente a quello dei geni *house-keeping* che mantengono l'integrità e la funzionalità delle cellule e dei geni responsabili del controllo del ciclo cellulare. Il differenziamento di organi/tessuti, infatti, richiede che le cellule concludano la fase proliferativa, escano dal ciclo cellulare e si specializzino o che attuino processi di morte programmata. Tutto questo richiede un preciso coordinamento tra segnali che dirigono la formazione di specifici tessuti e meccanismi che regolano il ciclo cellulare (Ohnuma and Harris 2003).

Capitolo 2

Stress ambientali & alterazione dell'embriogenesi

-  Stress e sviluppo embrionale
-  Stress ambientali di natura fisica: variazioni di temperatura
 - Effetti biologici dell'aumento della temperatura
 - Effetti biologici dell'abbassamento della temperatura
-  Stress ambientali di natura chimica: i metalli pesanti
 - Effetti biologici dei metalli pesanti tossici
 - Il cadmio
 - Effetti teratogeni del cadmio
-  Proteine a funzione citoprotettiva
 - Le metallotioneine (MT)
 - Le Heat Shock Proteins (HSPs)

2 Stress e sviluppo embrionale

Lo sviluppo embrionale è un processo finemente regolato, affinché vi sia una corretta progressione degli eventi è necessario che ad ogni singolo stadio l'embrione trovi le opportune condizioni che ne permettano la progressione verso lo stadio successivo. Ne consegue che l'embriogenesi si attua in funzione delle condizioni chimico-fisiche nelle quali i processi si realizzano. Alterazioni dello sviluppo possono essere causate da molti fattori ambientali. Le prime prove sperimentali che hanno dimostrato la vulnerabilità degli embrioni agli agenti ambientali si ebbero negli anni sessanta, quando Lenz e McBride, indipendentemente l'uno dall'altro, scoprirono che il Talidomide, un blando sedativo utilizzato in gravidanza, causa anomalie congenite, tra le quali la Focomelia, condizione nella quale sono alterate, o mancano del tutto, le ossa lunghe degli arti (Lenz and Knapp 1962; McBride 1978); l'anno seguente Rachel Carson dimostrò che il pesticida DDT distrugge le uova degli uccelli e impedisce la riproduzione di diverse specie (Carson, Darling et al. 1962). Le anomalie provocate da agenti esogeni sono definite disordini dello sviluppo, e le sostanze responsabili della loro insorgenza sono gli agenti teratogeni. La maggior parte dei teratogeni esplica i propri effetti soltanto in certi periodi critici dello sviluppo, nell'uomo ad esempio, il periodo di massima suscettibilità è quello compreso tra le tre e le otto settimane di sviluppo, che corrisponde al periodo in cui si formano la maggior parte degli organi.

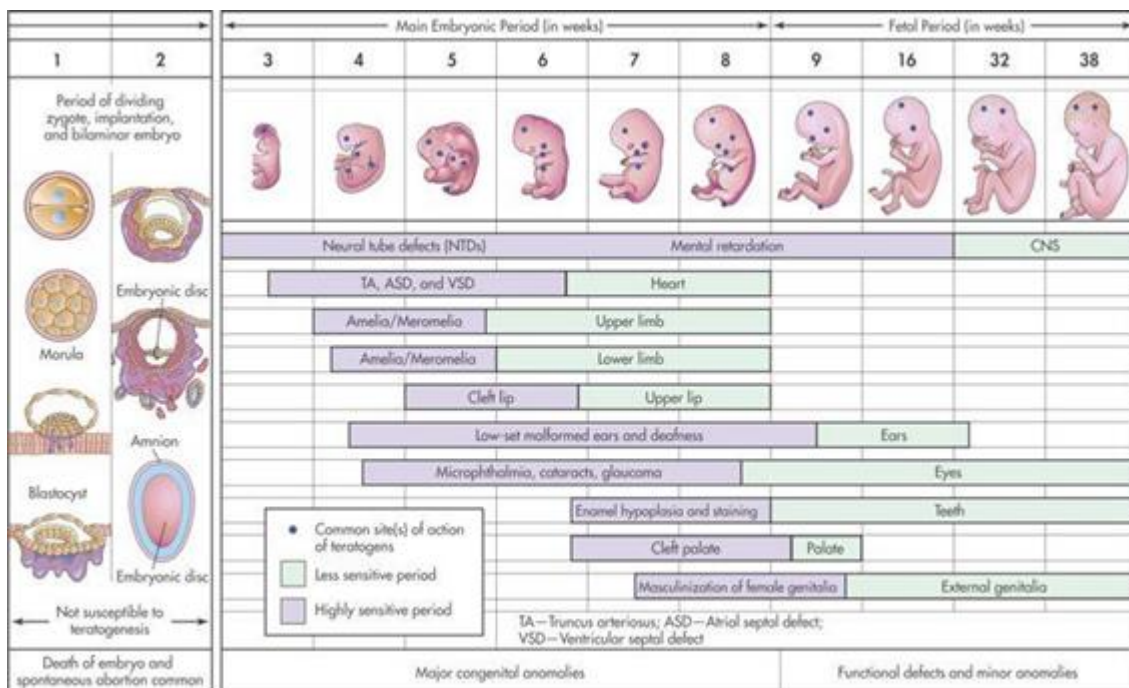


Figura 2.1: Effetti teratogeni nelle diverse fasi di sviluppo dell'embrione umano

Il sistema nervoso tuttavia, essendo in continua formazione, resta suscettibile durante tutto lo sviluppo embrionale. Nel periodo antecedente alle tre settimane, l'embrione, di solito, non è sensibile ai teratogeni, poiché in questo lasso di tempo, una sostanza o danneggia la maggior parte, se non tutte, le cellule dell'embrione causandone la morte, oppure danneggia un numero esiguo di cellule, consentendo all'embrione di riprendere lo sviluppo senza riportare danni (Moore and Persaud 1993).

Un agente stressorio deve possedere delle caratteristiche ben precise per provocare un effetto teratogeno nell'organismo:

- Deve indurre malformazioni caratteristiche, selettive per certi organi bersaglio. Ad esempio, è noto che l'acido Valproico, un farmaco antiepilettico, se assunto da donne gravide causa difetti spinali nel feto (Barnes, Mariani et al. 1996). La sostanza presa in esame può essere considerata teratogena perché porta allo sviluppo di una malformazione a carico sempre dello stesso organo;
- Deve esercitare i suoi effetti in un particolare stadio dello sviluppo fetale;
- Deve mostrare un'incidenza dose-dipendente (più è prolungato il contatto con la sostanza teratogena, più è facile che la sostanza generi la malformazione).

Esiste una vasta gamma di agenti teratogeni, rappresentati da stress fisici (come agenti ionizzanti, variazioni brusche di temperatura), stress chimici (farmaci e sostanze tossiche ambientali e/o industriali) e stress biologici (infezioni batteriche o virali). Tutti questi agenti possono influire sull'omeostasi cellulare con effetti negativi sulla stabilità del genoma, sino ad interferire, a diversi livelli, con i meccanismi che regolano l'espressione genica.

2.1 Stress ambientali di natura fisica: Variazioni di temperatura

Le modificazioni climatiche a cui è rivolta l'attenzione del mondo della ricerca sono essenzialmente riferibili all'aumento di temperatura che si sta verificando a livello globale. Si è concordi nel ritenere l'inquinamento atmosferico una delle principali cause del suo incremento. L'inquinamento atmosferico, dato dalla presenza di gas serra nell'atmosfera, ha origini sia naturali, che antropiche. Il riscaldamento globale rappresenta probabilmente la minaccia più pervasiva fra quelle attualmente individuate come imminenti sulla biodiversità, in quanto variazioni di temperatura, anche minime, possono innescare trasformazioni irreversibili e fenomeni imprevedibili negli organismi

viventi. Al riscaldamento globale potrebbero essere associate altre modifiche nei principali parametri climatici e impatti significativi sui sistemi fisici e biologici.

○ 2.1.1 Effetti biologici dell'aumento della temperatura

La temperatura ambientale influenza notevolmente la funzionalità delle cellule, gli effetti di una sua variazione si esplicano principalmente a carico di determinate classi di macromolecole biologiche temperatura-sensibili, come le proteine ed in particolare gli enzimi. Questi, fra tutte le proteine, sono probabilmente i più specializzati e i più importanti (Lehninger, Nelson et al. 2013) sono dei catalizzatori biologici, ovvero accelerano la velocità di una reazione chimica, abbassandone l'energia d'attivazione. Sono soggetti a denaturazione nel momento in cui il valore della temperatura, superando certi valori limite, è in grado di distruggere i legami che ne stabilizzano le strutture secondarie, terziarie e quaternarie. Una proteina denaturata, o vicina alla denaturazione, non sarà in grado di svolgere la propria funzione; l'elevata temperatura arreca un danno a livello molecolare, in quanto implica modifiche nella struttura, rendendo instabile la conformazione del sito attivo, fino a compromettere l'interazione con il substrato e quindi la catalisi della reazione. Ad esempio, la temperatura è in grado di influenzare i valori di pK dei gruppi R degli amminoacidi, ed il pH del mezzo in cui la proteina si trova; il risultato di queste modificazioni può essere una diversa distribuzione delle cariche elettriche sulla superficie della proteina stessa (Harris and Turner 2002). Una tale condizione può alterare la distribuzione degli amminoacidi ed interferire con il decorso della reazione enzimatica. Tale effetto va incontro ad amplificazione nel momento in cui si modifica lo stato di ionizzazione di amminoacidi presenti nel sito attivo dell'enzima e direttamente coinvolti nella catalisi.

Generalmente, gli enzimi non agiscono in modo isolato ma in sequenze altamente coordinate, catalizzando centinaia di reazioni consecutive e creando un intreccio armonioso tra le diverse vie metaboliche necessarie al sostentamento della vita. Il corretto funzionamento del metabolismo prevede un'ordinata sequenza di reazioni catalizzate da diversi enzimi; la differenza non è solo a livello della reazione catalizzata, ma anche a livello delle proteine che costituiscono tali enzimi. Ciò vuol dire che gli enzimi di una via metabolica, costituiti da proteine diverse per dimensioni e sequenza amminoacidica, molto probabilmente sono differenti anche per quanto riguarda la loro sensibilità ad una variazione di temperatura. Tali eventi potrebbero determinare la

perdita della relazione sequenziale all'interno della via metabolica considerata, con conseguenze non completamente prevedibili.

Recenti studi hanno evidenziato il ruolo della proteina istonica H2A.Z nel processo di denaturazione del DNA, a seguito dell'innalzamento della temperatura nell'organismo modello *Arabidopsis thaliana*. Tale proteina funge da sensore di temperatura, sfruttando le interazioni tra DNA e nucleosoma (Kumar and Wigge 2010).

○ 2.1.2 Effetti biologici dell'abbassamento della temperatura

In letteratura è noto che anche un abbassamento della temperatura rispetto al fisiologico range corporeo può avere degli effetti sugli organismi viventi. Studi effettuati sul rettile lacertiliano *Podarcis sicula* hanno consentito di valutare il ritmo circadiano a bassa temperatura (6°C), attraverso l'espressione di uno dei suoi componenti essenziali, il gene *Period2* (*Per2*). Quando la temperatura corporea della lucertola esposta a freddo si pone in equilibrio con la temperatura ambientale, l'attività locomotrice dell'animale scompare. L'espressione di *Per2* è ritmica e parallela al ritmo dell'attività locomotrice alle alte temperature (29°C), ma diventa costantemente alta alle basse temperature. Quando *Podarcis* è riesposta alle alte temperature, l'espressione ritmica di *Per2* si ristabilizza dopo 2 giorni di adattamento e coincide con la ripresa dell'attività locomotrice. L'alterazione del pattern di espressione di *Per2* a basse temperature indica che l'attività di controllo molecolare in queste condizioni è modificata (Magnone, Jacobmeier et al. 2005). Studi recenti sul teleosteo tropicale *Danio rerio* hanno dimostrato che l'esposizione dell'animale alle basse temperature inattiva l'ematopoiesi. Infatti, abbassando la temperatura dell'acqua a 17°C (contro i 27°C, che rappresenta la temperatura di mantenimento ottimale per questi animali), si è visto che l'espressione di diversi geni che codificano per fattori di trascrizione ematopoietici (*Runx1*, *scl*, *c-myb*, *GATA-2*) e per fattori correlati all'eritropoiesi (*klfd*, *hbaa1*, *ba1*, *GATA-1*, *EPO*, *EPOr*) risultano inibiti, mentre fattori correlati alla mielopoiesi risultano attivati (Kulkeaw, Ishitani et al. 2010; Kulkeaw, Ishitani et al. 2011).

2.2 Stress ambientali di natura chimica: i Metalli Pesanti

Gli effetti dell'inquinamento da metalli pesanti delle acque, del suolo e dell'atmosfera si ripercuotono sulla vitalità degli organismi e degli ecosistemi. L'uso dei metalli pesanti nelle attività industriali, nonché dei fertilizzanti e fitofarmaci in agricoltura, ha determinato un incremento della loro concentrazione nei suoli, incremento coadiuvato

da fenomeni di acidificazione dei terreni che ha determinato un aumento della loro biodisponibilità per tutte le specie viventi. A causa della loro elevata tossicità, la concentrazione dei metalli pesanti in vaste aree urbane e agricole ha raggiunto soglie "critiche" causando un decremento della fertilità del suolo e della biomassa (Harmens, Norris et al. 2010). Numerose ricerche hanno indicato che intossicazioni acute e/o croniche da inquinanti metallici determinano manifestazioni tossicologiche epidemiche ed endemiche nelle popolazioni (Spadaro and Rabl 2004). Essenziali o utili alla vita in piccole concentrazioni, molti metalli pesanti risultano tossici a concentrazioni di poco superiori. La sottigliezza dell'intervallo di concentrazioni che intercorre tra la manifestazione della carenza alimentare e l'effetto tossico desta preoccupazioni, in quanto richiede un'attentissima gestione dei flussi antropici (Fraga 2005).

Con la definizione di metalli pesanti vengono identificati quegli elementi la cui densità supera i 5g/cm^3 , tuttavia vengono considerati tali anche alcuni metalloidi (ad esempio l'arsenico, il bismuto ed il selenio) che possiedono proprietà simili. La maggior parte di essi rientra nella categoria dei "metalli di transizione". Tra le caratteristiche chimico/fisiche dei metalli pesanti ricordiamo:

- Comportamento da catione
- Differenti stadi di ossidazione
- Bassa solubilità dei propri idrossidi
- Affinità per i solfuri

Molti di questi elementi svolgono un ruolo essenziale per la vita partecipando a vari processi metabolici, principalmente con quattro funzioni:

- Funzione stabilizzatrice; esempio tipico è lo ione ferro nel gruppo eme di mioglobina ed emoglobina.
- Funzione strutturale; importante il silicio nei tessuti connettivi.
- Funzione ormonale; lo iodio è essenziale per gli ormoni tiroidei
- Ruolo di cofattore enzimatico; il selenio ad esempio agisce come cofattore per l'enzima glutathione perossidasi.

Possiamo classificare i metalli pesanti in due categorie principali: i micronutrienti metallici essenziali detti anche metalli traccia - ovvero metalli richiesti dagli organismi in quantità limitata - e i metalli non essenziali tossici, che non hanno funzioni metaboliche.

I Micronutrienti metallici

I metalli traccia se presenti a concentrazioni ottimali svolgono una serie di attività fondamentali per la cellula, comportandosi come micronutrienti essenziali (Riggio, Filosa et al. 2003) e partecipando a numerosi processi biochimici responsabili della crescita e della vita cellulare, mentre risultano tossici ad elevate concentrazioni. Il ferro, lo zinco ed il rame sono i principali elementi traccia, anche se sono fondamentali per il metabolismo cellulare anche il selenio, il cromo, il manganese ed il cobalto.

- Il ferro è un elemento appartenente alla prima serie dei metalli di transizione, è il quarto elemento della crosta terrestre in ordine di abbondanza ed il secondo tra i metalli (Edgerton, Bryant et al. 1972). La maggior parte del ferro sulla superficie terrestre non si trova allo stato libero ma è combinato con nichel, ossigeno, silicio o zolfo. Il ferro puro è un metallo argenteo piuttosto morbido la cui densità è $7,86\text{g/cm}^3$. In condizioni normali l'acquisizione del ferro da parte dell'organismo avviene per ingestione, e l'assorbimento si verifica a livello del duodeno. Il suo ruolo biologico si esplica in un gran numero di reazioni biochimiche e a livello cellulare, come le reazioni di ossido-riduzione (Shapira, Patz et al. 1984). Il contenuto di ferro nel corpo di un uomo adulto è di 4-5 grammi (Underwood 1985), la maggior parte dei quali è rappresentato dal Fe legato all'emoglobina e alla mioglobina.
- Lo zinco è un elemento appartenente alla prima serie dei metalli di transizione, a differenza degli altri metalli pesanti presenta un solo stato di ossidazione, quello +2. Esso si trova sulla crosta terrestre soprattutto sotto forma di minerale, in particolare il solfuro di zinco, ZnS , conosciuto come *sfalerite*, è il più abbondante. Lo zinco risulta essere un componente essenziale per la cellula, soprattutto per il suo ruolo di cofattore per molti enzimi epatici e pancreatici, inoltre è coinvolto anche nei meccanismi di replicazione, trascrizione e traduzione (Pories, Henzel et al. 1967; Dura Trave, Puig Abuli et al. 1984). Alcune patologie umane, come alterazioni della crescita e dello sviluppo, sono correlate alla carenza di zinco. Nei lieviti (Kamizono, Nishizawa et al. 1989) e nei Mammiferi (Palmiter and Findley 1995) sono state identificate le proteine omologhe ZnT1, localizzate a livello della membrana plasmatica, responsabili del trasporto dello zinco. L'assenza di tali proteine in linee cellulari mutate causa un'aumentata sensibilità alla tossicità dello zinco (Palmiter and Findley 1995).

- Il rame è un metallo rosso lucente con un'elevata conducibilità, è piuttosto duttile ed estremamente morbido. E' un elemento appartenente alla prima serie dei metalli di transizione ed ha densità pari a $8,97\text{g/cm}^3$. Esso si trova sulla superficie terrestre sia in forma libera che combinato con altri elementi, tuttavia in forma elementare si trova in quantità troppo modeste affinché possa costituire una fonte significativa del metallo. Lo si estrae quindi dai suoi minerali che comprendono *Calcocite*, *Calcopirite* e *Cuprite*. Il rame è un micronutriente essenziale nel metabolismo cellulare, in particolare nella sintesi del gruppo eme della citocromo ossidasi (Deibel, Ehmann et al. 1996). In vari modelli animali è stato dimostrato che la carenza di rame è associata ad anemie, osteoporosi e anomalie nella pigmentazione della pelle, ma anche alcune patologie umane sono associate ad alterazioni nel metabolismo del rame, come ad esempio alcune forme di cirrosi. Sono state identificate ATPasi transmembrana ad elevata affinità per il rame (CTR) responsabili del trasporto di questo micronutriente attraverso le membrane plasmatiche in *S. cerevisiae*, *S. pombe* (Dancis, Yuan et al. 1994; Laliberte and Labbe 2006) e nei vertebrati (Koch, Pena et al. 1997; Riggio, Lee et al. 2002).

I Metalli pesanti tossici

Appartengono a questa sottoclasse di metalli pesanti quelli, come cadmio, mercurio e piombo, che non sono normalmente presenti nelle cellule neanche in tracce, e pertanto risultano molto tossici a qualunque concentrazione.

- Il piombo è un elemento appartenente al 4° gruppo della tavola periodica, è un metallo morbido ad elevata densità ($11,34\text{g/cm}^3$). Sebbene non sia molto abbondante in natura viene estratto facilmente dal suo minerale più diffuso, la *galena*, PbS . Il piombo è ampiamente utilizzato nella fabbricazione degli accumulatori, nel rivestimento di cavi elettrici, ed è un importante componente di molte leghe usate in tipografia e per le saldature. L'assunzione del piombo da parte degli organismi avviene per ingestione ed assorbimento gastrointestinale, successivamente è veicolato mediante il torrente ematico ai tessuti molli e alle ossa. Come per il calcio - elemento con il quale il piombo compete sia per i siti di legame che per i trasportatori, a causa di una struttura estremamente simile - le ossa rappresentano il sito di stoccaggio maggioritario, e a seconda delle condizioni fisiologiche e nutrizionali del soggetto questo metallo può essere ritenuto o rilasciato dalle ossa creando un equilibrio con il piombo ematico (Alissa and Ferns 2011).

- Il mercurio appartiene alla terza serie dei metalli di transizione ed ha una densità di 13.55g/cm^3 . Il suo simbolo, Hg, deriva dal latino *Hydrargyrum* che significa argento liquido, infatti è l'unico metallo ad essere liquido a temperatura ambiente. Alcuni dei suoi utilizzi più importanti dipendono proprio da questa caratteristica, ad esempio è usato negli interruttori elettrici, nei termometri e nei barometri. Il mercurio è un elemento molto raro in natura, ma può essere ottenuto con facilità, mediante riscaldamento all'aria, dai minerali che lo contengono, come ad esempio dal *Cinabro*, HgS. Il mercurio forma leghe - definite *amalgame* - con tutti gli altri metalli, ad eccezione del ferro. Il suo composto più tossico è il dimetilmercurio, $\text{CH}_3\text{-Hg-CH}_3$, un composto metallorganico volatile, nel quale i gruppi alchilici sono legati ad un atomo metallico (Gillespie and Wolf 2004). Il mercurio viene internalizzato dall'organismo attraverso l'alimentazione e attraverso le vie respiratorie (Alissa and Ferns 2011).
- Il cadmio tra tutti i metalli pesanti tossici merita una particolare attenzione poiché ampiamente utilizzato in molte produzioni industriali poco o per nulla controllate, e verrà trattato nel prossimo paragrafo.

○ 2.2.1 Effetti biologici dei Metalli Pesanti tossici

L'arsenico (As), il cadmio (Cd), il mercurio (Hg) e il piombo (Pb) sono stati identificati come la più probabile causa di malattie associate ai metalli pesanti osservate in medicina (Hu 2000). La tossicità dei metalli pesanti ad elevati livelli di esposizione è ben conosciuta, ma anche un'esposizione costante a livelli relativamente bassi di questi inquinanti potrebbe portare ad effetti nocivi cronici sulla salute. Nonostante negli ultimi anni sia stato riscontrato un globale decremento nell'esposizione dell'uomo a questi metalli, sono ancora molte le fonti di esposizione quotidiana da ricercarsi soprattutto nelle abitazioni e nei luoghi di lavoro. Tali sostanze possono essere presenti in molti prodotti utilizzati quotidianamente, come alcuni cosmetici quali lucidalabbra, trucco per gli occhi, polvere di talco e creme per il corpo (Sainio, Jolanki et al. 2000). Altre fonti nascoste possono includere giocattoli, caramelle e spezie nonché alcuni rimedi medici tradizionali-popolari (Woolf and Woolf 2005). I metalli pesanti sono tossici perché possono avere effetti deleteri cumulativi, che causano alterazioni degenerative croniche soprattutto al sistema nervoso, fegato e reni (Chisolm 1970; Chisolm 1980; Wegner 2002). Il meccanismo di tossicità di alcuni è ancora sconosciuto, sebbene si sappia che molti dei loro generano effetti insalubri attraverso la formazione di radicali liberi, danni al DNA, perossidazione dei lipidi ed inattivazione delle proteine sulfidriliche, es. il

glutazione (Valko, Morris et al. 2005). Ad oggi, non ci sono dati sufficienti per stabilire un valore soglia al di sopra del quale ciascun metallo pesante eserciti i suoi effetti nocivi. Definire questa soglia risulta estremamente complesso, poiché essa è popolazione-dipendente, dovuta cioè a differenze esistenti tra le popolazioni stesse, per ciò che concerne le abitudini alimentari - in particolare l'assunzione di antiossidanti - o differenze nel sistema immunitario dettate da basi genetiche. Questi metalli non hanno funzione metabolica, e quando sono presenti nell'organismo distruggono vari processi cellulari risultando tossici per alcuni organi. Gli effetti tossici risultano essere tempo e dose dipendente, inoltre l'intossicazione può avere effetti cronici e acuti sulla salute dell'uomo. Ad esempio, studi clinici hanno riportato che Ar induce malattie cardiovascolari, inclusa ipertensione, disfunzioni coronariche ed infarto, in modo dose-dipendente (Chiou, Huang et al. 1997). Recentemente è stato ipotizzato il coinvolgimento dell'esposizione ai metalli pesanti nell'insorgenza di malattie cardiovascolari. In particolare si sospetta che inducano rilevanti cambiamenti fisiopatologici - come incremento degli stress ossidativi, risposte infiammatorie ed attività coagulative - che nel complesso promuovano l'aterosclerosi (Alissa and Ferns 2011). I loro ioni, in particolare, sono stati classificati dall'agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) come agenti cancerogeni. Vi sono molteplici meccanismi attraverso i quali questi agenti tossici promuovono lo sviluppo neoplastico, alcuni sono comuni alla maggior parte di questi metalli - come la formazione di radicali liberi quali ROS e/o RNS - altri invece dipendono dalle caratteristiche proprie dei singoli ioni - Ar, ad esempio, tende a sostituire il fosfato inorganico nella fosforilazione ossidativa, il Cd distrugge le adesioni cellula-cellula, il cromo nella sua forma trivalente va a legare direttamente il DNA ed infine il nickel interferisce con la metilazione del DNA e con le istone-acetilasi (Koedrith and Seo 2011). Tra questi meccanismi i più comuni sono:

- Induzione di stress ossidativi che recano danno ai componenti cellulari, in particolare al DNA;
- Interferenza con i sistemi di riparo del DNA, che causano instabilità genomica;
- Interruzione della crescita e della proliferazione cellulare mediante modificazioni dei pathways di trasduzione genica, o disregolazione dei geni oncogeni ed oncosoppressori.

○ 2.2.2 Il Cadmio

Il Cd (dal latino *cadmia*, a sua volta dal greco *kadmeia*, calamina=scaglia di laminazione) è un elemento appartenente alla seconda serie dei metalli di transizione ed ha una densità pari a 8,6g/cm³. E' un metallo di colore argento-bianco, raro e tossico, con peso atomico di 112,4g mol/l, fonde a 321°C e bolle a 765°C. E' malleabile, duttile e tenero al punto che può essere tagliato con un normale coltello. La chimica del Cd somiglia a quella dello zinco, in quanto i due metalli hanno la stessa configurazione elettronica esterna (d¹⁰s²) e soltanto gli elettroni s vengono utilizzati nella formazione dei composti, ma a differenza dello zinco il Cd tende a formare composti più complessi, nei quali assume numero di ossidazione +2. Molti composti inorganici del Cd sono solubili in acqua, ad esempio, il Cd acetato, cloruro e solfato; mentre l'ossido e il solfuro di Cd sono praticamente insolubili. L'ossido ed il carbonato di Cd possono, tuttavia, essere solubili al pH gastrico.

Distribuzione ed utilizzi del Cadmio

Il Cd è un metallo pesante, presente nella crosta terrestre in concentrazioni molto basse (circa 1mg/Kg). In natura non si trova in forma elementare ma sempre complessato ad altri elementi; tra le sue forme minerali, rare e reperibili in piccole quantità, la *Greenockite* (CdS) è la più diffusa e spesso associata alla *sfalerite* (ZnS), quindi il cadmio viene estratto in genere come sottoprodotto dell'estrazione e della raffinazione dello zinco e in minor misura del piombo e del rame. Piccole quantità di Cd provengono dal riciclaggio dei rottami del ferro e dell'acciaio. Esso viene usato soprattutto nella cadmiatura, un trattamento metallurgico mediante il quale viene depositato su altre superfici metalliche al fine di proteggerle dalla corrosione. E' ampiamente utilizzato anche in combinazione con altri metalli, ad esempio in lega con piombo, stagno e bismuto è adoperato per preparare metalli fusibili, utilizzati nella produzione di svariate apparecchiature elettriche, mentre in lega con lo zinco è adoperato nella fabbricazione di cuscinetti e nella saldatura. Il Cd metallico, grazie all'elevato potere di assorbimento dei neutroni, è utilizzato nella produzione delle barre di controllo per i reattori nucleari, i suoi sali, invece, trovano impiego in campo fotografico e nella fabbricazione di fuochi artificiali, gomme, vernici fluorescenti, vetri e porcellane. Il solfuro (CdS), un composto giallo chiaro, è usato come pigmento e trova applicazione anche nella realizzazione di celle fotovoltaiche; le celle elettrochimiche Ni/Cd sono ampiamente utilizzate in settori

specialistici e per la produzione delle sigarette. Il Cd, quindi, è un metallo utilizzato in molti processi industriali e pertanto la sua distribuzione nel suolo è significativamente variata negli ultimi decenni in funzione della continua e crescente antropizzazione. Secondo la World Health Organization (2007) ci sono tre principali fonti antropogeniche di Cd:

- Deposizione atmosferica; il Cd volatile, derivante da processi di combustione e trasportato dal vento, può depositarsi sulla terra, nelle acque e nei sedimenti, entrando a far parte di cicli geochimici globali che ne determinano una continua circolazione tra i vari comparti ambientali
- Utilizzo, in agricoltura, di fertilizzanti artificiali a base di fosforo
- Utilizzo di acque di scottatura fognaria per irrigare i suoli agricoli

Dal suolo o dagli altri comparti ambientali, il Cd può essere accumulato direttamente, o tramite catena alimentare, nei tessuti di tutti gli organismi viventi. Infatti, nei terreni acidificati, viene assorbito dalle piante e successivamente ingerito dagli animali erbivori accumulandosi nelle loro cellule, tessuti ed organi. Negli ecosistemi acquatici può bioaccumularsi in mitili, ostriche, gamberi, aragoste e pesci.

Tossicità ed assorbimento del Cadmio

Il Cd è un metallo pesante estremamente dannoso per la salute umana, i cui effetti tossici si manifestano a dosi di esposizione nettamente inferiori rispetto agli altri metalli pesanti (Fassett 1975). La popolazione può assumere il Cd dall'ambiente circostante attraverso l'ingestione di cibo o acqua contaminati, inalazione di particolati ambientali o fumo di sigaretta, ingestione accidentale di terreni e polveri. Il Cd, una volta penetrato nell'organismo, interferisce con una moltitudine di processi cellulari come ad esempio: progressione del ciclo cellulare, apoptosi, sintesi e riparo del DNA, proliferazione e differenziamento cellulare (Bertin and Averbeck 2006). Inoltre, l'esposizione a lungo termine a basse dosi di Cd inficia la funzionalità di vari organi determinando: lesioni epatiche, ostruzione polmonare, osteoporosi, malattie cardiovascolari e neurologiche (Klaassen, Casarett et al. 2013). Il Cd è stato definito dall' IARC (2009) come un potente cancerogeno ed è implicato nell'insorgenza del cancro ai polmoni, alla prostata, al pancreas, ai testicoli e ai reni. La principale proprietà tossicologica del Cd risulta essere un'emivita biologica estremamente lunga (10-30 anni), associato ad un tasso di escrezione corporea estremamente basso (Nawrot, Staessen et al. 2010). Il Cd, all'interno dell'organismo, è accumulato principalmente nel fegato, all'interno del quale

viene legato dal Glutatione (GSH) ed escreto nella bile. Nel sangue, invece, è legato dalle Metallothioneine (MT) ed una parte di esso viene stoccato, mentre un'altra parte passa nel plasma ed è assorbito dai reni; l'equilibrio tra il Cd complessato alle MT, Cd-MT, ed il metallo libero nei tessuti renali potrebbe determinare il suo grado di nefrotossicità (Jin, Nordberg et al. 1987). Il fegato e i reni, quindi, rappresentano i siti maggioritari di accumulo di questo metallo, con il fegato che contiene dal 30% al 50% del Cd presente all'interno dell'organismo. Per i non fumatori il cibo ne costituisce la principale fonte (oltre il 90%) (2011). Il valore soglia di tollerabilità di assunzione per il Cd, basato sugli effetti cronici sulla funzionalità renale, definito dalla FAO e da WHO (1993) è di 1µg/Kg corporeo al giorno. L'assorbimento polmonare del Cd inalato ammonta a circa il 10-50%, mentre solo il 3-7% di quello ingerito viene assorbito dall'apparato gastro-intestinale (Bend, Bolger et al. 2007). Tuttavia la suscettibilità alla tossicità del Cd ed il tasso di assorbimento possono variare da individuo a individuo principalmente a causa di due fattori:

- Variazioni genetiche degli enzimi coinvolti nella risposta al Cd. In particolare, le variazioni a carico del gene della glutatione-s-trasferasi (GST) risultano estremamente significative, poiché esso svolge un ruolo fondamentale nella biotrasformazione e nella detossificazione del Cd (Strange, Jones et al. 2000). La GST catalizza la reazione di legame dei gruppi idrofobici ed elettrofili con il glutatione ridotto, il complesso stabile che ne risulta, GSH-Metallo pesante, viene trasportato al di fuori della cellula ed escreto tramite urina o bile (Ballatori 2002). Le GSTs appartengono ad una famiglia genica composta da sei membri, sono stati trovati polimorfismi per i geni GSTM1, GSTP1 e GSTT1 che determinano variazioni e alterazioni nel sito attivo dell'enzima, e sono stati associati ad un'incrementata suscettibilità alla tossicità al Cd (Ketelslegers, Gottschalk et al. 2008). Il genotipo GSTP1 esibisce una mutazione non sinonima nel codone 105 che sostituisce una valina con una isoleucina, mentre GSTT1 e GSTM1 mostrano delezioni alleliche che riducono l'attività enzimatica, in particolar modo i soggetti con la variante omozigotica Val/Val del genotipo GSTP1 risultano quelli con tasso ematico di Cd superiore rispetto agli altri (Khansakorn, Wongwit et al. 2012).
- L'altro fattore che ne potrebbe influenzare il tasso d'assorbimento è lo stato nutrizionale del soggetto. Vi è una correlazione diretta fra la quantità di micronutrienti metallici presenti nell'organismo e la quantità di Cd che viene assorbita, infatti l'omeostasi dei metalli essenziali è influenzata dall'esposizione al Cd

e al contempo gli effetti di quest'ultimo dipendono dalla presenza/assenza di questi metalli essenziali (Messaoudi, El Heni et al. 2009). Il Cd entra nelle cellule attraverso i meccanismi di trasporto sviluppati per gli altri ioni, in particolar modo quelli bivalenti. Una carenza nutrizionale di Ca, Fe e Zn determina un aumento dell'assorbimento intestinale di Cd, da dati in letteratura emerge che la deficienza di ioni Fe provoca una sovraespressione dei trasportatori del ferro duodenali, i quali possono essere utilizzati dal Cd per entrare nelle cellule. Questo spiega il motivo per il quale le donne in età riproduttiva, avendo una maggiore carenza di ferro, sono soggetti più a rischio rispetto agli uomini (Menke, Muntner et al. 2009); sono considerati soggetti a rischio, inoltre, i fumatori e i vegetariani. D'altro canto recenti studi epidemiologici mostrano gli effetti antiossidanti dello zinco contro la tossicità del Cd, probabilmente stimolando la produzione delle MT (Messner, Knoflach et al. 2009).

Meccanismi d'azione del Cadmio

Il Cd penetra nella cellula utilizzando i canali del Ca voltaggio dipendenti o, in alternativa, i canali e i trasportatori associati ai recettori transmembrana, come il DMT-1 (Simovich, Conrad et al. 2002). Una volta internalizzato si lega ai costituenti citoplasmatici e nucleari interferendo con i normali processi di proliferazione e differenziamento cellulare. Come già detto, il Cd, essendo chimicamente molto simile agli ioni bivalenti Ca, Fe e Zn, li sostituisce nei meccanismi di trasporto e nei siti di legame (Gachot and Poujeol 1992) alterando la loro omeostasi e il loro turnover cellulare. Questo metallo si lega direttamente ai residui cisteinici delle proteine (Kagi 1991) e, con alta affinità, anche ai domini Zinc-binding di molte metalloproteine, interferendo o addirittura bloccando le funzioni cellulari Zn-dipendenti (Thirumoorthy, Manisenthil Kumar et al. 2007). Il Cd è un metallo redox-inerte, ovvero è incapace di generare reazioni redox nei sistemi biologici (Koedrith and Seo 2011), tuttavia è in grado di indurre stress ossidativo riducendo i livelli cellulari degli antiossidanti endogeni. Esso si lega ai gruppi tiolici di molte proteine che svolgono questo ruolo, quali catalasi, glutatione perossidasi, perossido dismutasi e glutatione reduttasi, causando la loro inattivazione e di conseguenza l'accumulo di ROS nelle cellule (Ikediobi, Badisa et al. 2004)). Indirettamente, questa iperproduzione di molecole ossidanti causa la produzione di proteine mal ripiegate o aberranti e perossidazione dei lipidi. Nel nucleo, il Cd induce rotture nel DNA e inibizione dei meccanismi di riparo, nonché cambiamenti

epigenetici come incremento della metilazione del DNA (Takiguchi, Achanzar et al. 2003). Concentrazioni citotossiche di Cd, inoltre, esercitano marcati effetti anche sulla sintesi proteica che risulta in alcuni casi inibita, in altri marcatamente aumentata. Ne sono un tipico esempio proteine quali i proto-oncogeni, oncosoppressori e proteine a funzione protettiva, come le MT, le heat shock proteins, la catalasi e l'ubiquitina.

○ 2.2.3 Effetti teratogeni del cadmio

Gli effetti teratogeni del Cd in molte specie di vertebrati sono ben documentati da diversi autori (Ferm and Carpenter 1968; Messerle and Webster 1982; Sunderman, Plowman et al. 1992; Thompson and Bannigan 2001): malformazioni del sistema nervoso centrale, degli arti, della faccia, degli occhi e dell'apparato digerente sono state riscontrate in diverse specie, sebbene con modalità differenti secondo il grado di esposizione. Il Cd può causare morte fetale, malformazioni e ritardi nello sviluppo in criceti (Ferm 1971) e ratti (Barr 1973; Holt and Webb 1987). La somministrazione di determinate quantità di Cd a diversi ceppi di roditori da laboratorio durante il periodo di gestazione provoca nei feti un ampio spettro di malformazioni embrionali; le variazioni morfologiche osservate dipendono dalle dosi, dai tempi d'inoculazione e dai differenti ceppi esaminati (Webster and Messerle 1980). Nei topi le malformazioni più frequenti si verificano nel tubo neurale, nella regione cranio-facciale, nei visceri, nello scheletro, negli arti e nel tronco (Padmanabhan and Hameed 1990). Gli effetti teratogeni variano ampiamente anche tra topi della stessa razza, i quali mostrano una diversa sensibilità al metallo, confermando, così, l'importanza del background genetico degli animali trattati (Hovland, Cantor et al. 2000). Negli embrioni di pollo trattati con Cd si è registrato un tasso di mortalità del 35% circa (il 40% di essi presentava difetti nella parete ventrale del corpo con irregolari posizionamenti degli arti inferiori), mentre quelli che sopravvivevano avevano un peso ridotto rispetto al normale (Thompson and Bannigan 2001). Esperimenti condotti su embrioni di *Xenopus* esposti a Cd hanno rilevato anomalie cardiache, facciali, intestinali e della notocorda (Plowman, Peracha et al. 1991). I meccanismi attraverso i quali il Cd modula i livelli di espressione genica rimangono ancora per lo più sconosciuti, ma sembra chiaro che più di un automatismo entri in gioco per l'accensione o lo spegnimento di determinati geni. Carginale e coll. (Carginale, Capasso et al. 2002) in una ricerca condotta sull'osteitico antartico *Chionodraco hamatus* hanno evidenziato che i geni regolati dal Cd nel fegato sono di due differenti tipologie, quelli attivati e quelli inibiti dal metallo. Il primo tipo comprende i geni che codificano le HSP e la proteina

omologa alla GP49 di *Sparus aurata*, il secondo tipo, invece, include il gene della transferrina e il gene che codifica per una proteina omologa alla proteina T2K del topo, che ha un ruolo attivo nella prevenzione dell'apoptosi.

Le alterazioni Cd-indotte che si manifestano nell'embrione sono soprattutto legate ad un aumento della frequenza di cellule in apoptosi (Chan and Cheng 2003). E' stato dimostrato che, dopo trattamento con Cd si verifica una sovraespressione dei geni p53, p21 e bax associata ad una concomitante riduzione dell'espressione di Bcl-2 (Fernandez, Gustafson et al. 2003). Studi recenti hanno rivelato, tramite esperimenti di silenziamento genico, la centralità del ruolo svolto dal gene Ambra-1 (Fimia, Stoykova et al. 2007) nel controllo della proliferazione e della sopravvivenza delle cellule del sistema nervoso in via di sviluppo. La sua mancata espressione induce alterazioni morfologiche del CNS simili a quelle osservate in embrioni del lacertile *Podarcis sicula* (Simoniello, Filosa et al. 2010; Simoniello, Motta et al. 2011) e di *Danio rerio* (Chow, Hui et al. 2008) trattati con Cd. Inoltre la mancanza di autofagia nel tessuto neurale dei topi mutanti in Ambra-1 è anche associata ad un aumento di cellule apoptotiche, dimostrando in tal modo l'esistenza di una stretta relazione tra autofagia, apoptosi e proliferazione cellulare. Gli effetti del cadmio (così come accade per ulteriori agenti stressori) sullo sviluppo embrionale possono essere attenuati dalla presenza di numerosi fattori cellulari che hanno funzione protettiva, quali ad esempio le "*metal binding proteins*" e, in particolare, dalle metallotioneine e/o dal loro messaggero espresso negli embrioni di varie specie di vertebrati (Riggio, Filosa et al. 2003). Ricerche condotte sul lacertide *Podarcis sicula*, trattato con dosi subletali di Cd, mostrano che le alterazioni più frequenti si riscontrano nell'encefalo e nell'occhio. In particolare, le alterazioni nella regione encefalica colpiscono le vescicole anteriori quali telencefalo, diencefalo e mesencefalo, mentre, a livello dell'occhio le alterazioni più significative si verificano a carico della retina, solo occasionalmente nella mucosa olfattiva, negli organi vomero-nasali e nei canali semicircolari dell'orecchio (Simoniello, Filosa et al. 2010; Simoniello, Motta et al. 2011). Dal punto di vista molecolare, in embrioni di *Podarcis* trattati con cadmio (Trinchella, Cannetiello et al. 2010), si è evinta un'alterazione dell'espressione di trascritti inerenti la membrana plasmatica e la regolazione dell'espressione genica. Gli effetti teratogeni del cadmio sembrano manifestarsi direttamente, modificando l'equilibrio elettrochimico della membrana e agendo su fattori trascrizionali correlati a geni strettamente legati allo sviluppo embrionale, ed indirettamente, causando una serie di meccanismi a catena che regolano attività cellulari e geni fondamentali

dell'embriogenesi. Questa osservazione fa supporre, quindi, che le risposte al cadmio riscontrate in *Podarcis* siano risposte molecolari generali da parte di cellule sottoposte a stress e che possono avere come conseguenza il danneggiamento dei processi alla base della normale omeostasi e del fisiologico funzionamento cellulare.

2.3 Proteine a funzione protettiva

La cellula è dotata di meccanismi di protezione che riescono a bloccare in una certa misura i danni causati da metalli pesanti e situazioni stressanti. Tra questi meccanismi spicca la funzione di due classi di proteine anti stress: le metallotioneine (MT) e le heat shock protein (HSP). Le prime hanno un'azione più specifica anti-metallo (Hamer 1986), le seconde un'azione più generica anti-stress (Giudice, Sconzo et al. 1999).

2.3.1 Le metallotioneine (MT)

Le MT sono proteine a basso peso molecolare (6-7 KDa), in grado di complessarsi ai metalli pesanti grazie alla presenza di numerosi residui cisteinici presenti lungo la loro catena. Esse rappresentano una famiglia di proteine altamente conservate, presenti nei procarioti e negli eucarioti sia vegetali che animali (Hamer 1986; Scudiero, Temussi et al. 2005). Essendo normalmente espresse nelle cellule, in condizioni fisiologiche, esse svolgono il ruolo fondamentale di sequestrare\rilasciare gli ioni zinco e rame presenti nella cellula, svolgendo così la funzione di modulatori dell'effettiva concentrazione intracellulare di questi due metalli essenziali (Ghoshal, Wang et al. 1998; Jiang, Vasak et al. 2000). Le MT sono presenti in quasi tutti i tessuti e tipi cellulari anche se sono particolarmente abbondanti nei tessuti parenchimatosi, quali il fegato e il rene (Trinchella, Riggio et al. 2006) dove svolgono un'azione detossificante. Oltre alla funzione omeostatica diretta nei confronti dei metalli essenziali, le MT riescono a svolgere la loro funzione detossificante anche nei confronti di metalli non essenziali, come il Cd^{2+} , che legano neutralizzandoli (Palmiter, 1998). I geni che codificano per le MT hanno, nella regione del promotore una o più sequenze nucleotidiche lunghe da 12 a 15 paia di basi, note come "Metal Regulatory Elements" (MRE). In tutti i vertebrati, il gene che codifica per le MT ha una struttura tripartita costituita da tre esoni intervallati da due introni alle posizioni aminoacidiche 9 e 31 o 32 (Shworak, O'Connor et al. 1993). Nella maggior parte delle specie studiate, le MT mostrano polimorfismo genetico. Le isoforme codificate da geni non allelici possono essere separate mediante cromatografia a scambio ionico o elettroforesi (Richards 1991) e si è convenuto di identificarle con le

sigle MT I e la MT II. In seguito sono state identificate altre forme di MT tessuto-specifiche. In particolare dal tessuto renale di feto umano è stata purificata una isoforma, denominata MT-0 (Soumilion, Van Damme et al. 1992); nel tessuto cerebrale umano è stata caratterizzata una MT, detta MT-III, abbondante nel cervello degli individui sani, la cui quantità è notevolmente ridotta nel cervello di individui affetti dal morbo di Alzheimer (Uchida, Takio et al. 1991) topi che non esprimono tale forma di MT risultano essere più suscettibili a processi neurodegenerativi associati ad epilessia indotta. Infine una MT, detta MT IV, codificata da un gene ancora diverso dai precedenti, è stata isolata dal tessuto epiteliale murino e umano (Quaife, Findley et al. 1994).

Struttura delle MT

Le MT sono proteine ubiquitarie a basso peso molecolare ed alto contenuto di aminoacidi solforati e metalli a cui devono il loro nome. Nei vertebrati sono caratterizzate da un peso molecolare di 6000-7000 Da, contengono da 60 a 68 aminoacidi di cui 20 Cys tutte coordinate con legami metallici che legano 7 equivalenti di ione metallico bivalente e mancano di aminoacidi aromatici.

Nonostante le sequenze amminoacidiche siano diverse, tutte le MT hanno caratteristiche strutturali simili: -forma a manubrio; -due domini; -diverse unità tetrameriche Me(II)-Cys; -tutte le Cys coinvolte nel legame con lo ione metallico; -assenza di struttura secondaria.

Ruolo delle MT

Le metallotioneine, espresse nella cellula in condizioni fisiologiche, svolgono il ruolo fondamentale di sequestrare\rilasciare gli ioni zinco e rame presenti nella cellula, svolgendo così la funzione di modulatori dell'effettiva concentrazione intracellulare di questi due metalli (Jacob, Maret et al. 1998). In condizioni fisiologiche il compito delle MT è quello di sequestrare lo ione zinco, mantenendo bassa la sua concentrazione nella cellula. Il ruolo delle MT può mutarsi da accettore a donatore dello zinco, quando tale ione è richiesto in quantità massiva dalla cellula, per esempio durante la proliferazione cellulare (Vallee and Auld 1993) Inoltre si ritiene che le MT fungano da deposito e da trasportatori intracellulari di zinco e che siano in grado di rilasciare e ridistribuire lo zinco nella cellula in situazioni di emergenza (Chan and Cherian 1993). Sebbene il legame delle MT con il metallo sia molto forte, la proteina può cedere uno dei suoi atomi di metallo ad apoenzimi. Il trasferimento del metallo ai metallo-enzimi non avviene in modo diretto, come ipotizzato in principio (Udom and Brady 1980), ma evidenze

sperimentali hanno dimostrato che le MT interagiscono con appropriati ligandi come il glutatione. Queste proteine hanno un ruolo (Chan and Cherian 1993)esse legano efficacemente il rame, mentre in condizioni ossidanti possono rilasciarlo (Fabisiak, Tyurin et al. 1999). Oltre alla funzione omeostatica, le MT assolvono anche una funzione detossificante nei confronti di metalli non essenziali, come il Cd^{2+} , che legano stabilizzandoli in una forma non tossica (Palmiter 1998).

Induzione delle MT

Caratteristica fondamentale delle MT, imprescindibile per la loro funzione biologica, è l'inducibilità, meccanismo che costituisce la difesa più rapida ed efficiente da parte degli organismi viventi all'esposizione dei metalli tossici. La sintesi di queste proteine è correlata a numerose situazioni di stress, in particolare all'esposizione delle cellule o dell'organismo a concentrazioni elevate di metalli. L'espressione del messaggero e la sintesi delle MT è indotta oltre che dai metalli, anche da fattori di crescita, prodotti di oncogeni, secondi messaggeri come c-AMP e diacilglicerolo, vitamine ed ormoni (Samson and Gedamu 1998). Comunque tra i vari agenti che inducono la sintesi delle MT, i metalli restano gli induttori più potenti. I geni codificanti le MT condividono, nella regione del promotore, motivi oligonucleotidici presenti in copie multiple, noti come "metal regulatory elements" (MRE). Questi motivi consistono di un "core" conservato di sette nucleotidi fiancheggiato da una sequenza semiconservata. E' stata formulata l'ipotesi che le sequenze MRE funzionino riconoscendo fattori di trascrizione specifici, che, quando attivati da metalli pesanti, si legano al DNA in prossimità del promotore del gene dell'MT, inducendone l'espressione (Andrews 1990).

2.3.2 Le Heat Shock Proteins (HSPs)

Oltre alle MT la seconda classe di proteine a funzione protettiva è rappresentata dalla famiglia delle heat shock proteins (HSPs).

Le heat shock proteins sono conosciute anche come proteine dello stress (SP), sono proteine indotte da shock termico, altamente conservate e presenti in tutte le cellule e in tutti gli organismi (Lee and Vierling 2000). Sono state scoperte in cellule sottoposte ad alte temperature (Ciocca, Oesterreich et al. 1993). Tali proteine proteggono le cellule dai danni indotti da stress ambientali e fisiopatologici, inclusi shock termico, stress ossidativo, sostanze chimiche nocive (Lindeman, Skarpen et al. 1998), radiazioni, metalli pesanti (Multhoff and Botzler 1998). Molti studi hanno dimostrato che nella cellula

l'espressione delle HSP è coinvolta nella crescita cellulare, mantenimento e sviluppo (Iida 1985; Marcuccilli and Miller 1994). Quindi queste proteine sono espresse in condizioni fisiologiche nella cellula dove esse giocano un ruolo fondamentale in quanto si occupano del trasferimento delle proteine nel corretto compartimento subcellulare, nell'assemblamento e ripiegamento delle proteine, nel prevenirne la degradazione (Gething and Sambrook 1992). L'espressione delle HSPs è correlata con l'aumento del tasso di sopravvivenza della cellula nel momento in cui viene a contatto con particolari fattori esterni (Huot, Roy et al. 1991; Lavoie, Hickey et al. 1993; Wu and Welsh 1996). Si osserva un aumento della loro concentrazione nel momento in cui la cellula viene sottoposta a particolari situazioni stressanti, come ad esempio: trattamento con metalli pesanti, anossia e shock termico. Le HSP sono classificate in 6 famiglie in base alla loro massa molecolare: le HSPs ad alto peso molecolare (≥ 100 KDa), HSP90 (81-99KDa), HSP70 (65-80 KDa), HSP60 (55-64 KDa), HSP40 (35-54 KDa) e le small HSP (≤ 34 KDa) (Minami, Hohfeld et al. 1996). E' stato dimostrato, in alcuni invertebrati e vertebrati, che l'espressione di particolari HSP (70-60-27) (Guvén, Duce et al. 1995) aumenta in presenza di cadmio (Kammenga, Arts et al. 1998; Schroder, Hassanein et al. 1999; Kim, Yoon et al. 2005) ed in particolare la concentrazione delle HSPs 60 aumenta in seguito ad esposizione acuta (Curtis, Nonavinakere et al. 1996). In condizioni fisiologiche HSP70 contribuisce alla protezione del miocardio dai danni ischemici (Marber, Mestril et al. 1995). La funzione protettiva di HSP70 a livello del miocardio è legata alla sua abilità di prevenire l'aggregazione delle proteine durante lo stress ischemico.

Ruolo delle HSPs

La risposta allo shock termico fu scoperta nel 1962 da Ritossa, osservando gli effetti dello shock termico sui cromosomi politenici della *Drosophila buschii* (Ritossa 1996). E' stato poi in seguito dimostrato che tutti gli organismi hanno una comune risposta allo stress, caratterizzata da un drastico cambiamento del pattern di espressione genica e da una elevata sintesi di una famiglia di proteine indotte dallo shock dette heat shock protein (HSPs). La risposta allo stress può anche indurre un segnale di morte che culmina nell'apoptosi o nella rapida necrosi. L'accumulo di proteine non correttamente ripiegate in cellule stressate, è il segnale che determina l'espressione delle HSP, che prevengono l'aggregazione delle proteine e facilitano il ripiegamento o l'eliminazione di proteine non adeguatamente ripiegate, grazie alla loro capacità di chaperoni. Gli chaperoni HSPs100 condividono un comune dominio ATPasico e appartengono alla

famiglia delle AAA+ (adenosina trifosfato associato con diverse attività). Nel lievito, HSP140 controlla l'aggregazione e la disaggregazione delle proteine, nei mammiferi il suo omologo non è stato ben identificato (Shorter and Lindquist 2004). Gli chaperoni HSP90 funzionano come elemento perno nelle cellule eucariotiche stabilizzando le proteine non ripiegate e regolando differenti segnali proteici come i recettori dell'ormone steroideo, della tirosin chinasi e calcineurina (Young and Hartl 2002). Gli chaperoni HSPs60 sono complessi eptamerici che posseggono una larga cavità centrale nella quale avviene il ripiegamento proteico. I membri della famiglia eucariotica HSP60 (I gruppo di chaperonine) sono presenti nei mitocondri in associazione con un cofattore della famiglia delle HSPs10. Altri chaperoni (II gruppo di chaperonine) come TRic che non hanno un cofattore HSPs10 sono stati scoperti nel citosol eucariotico (Muchowski and Wacker 2005). Gli chaperoni HSPs70 hanno un dominio conservato N-terminale ATPasico che lega ed idrolizza l'ATP e un dominio C-terminale substrate-binding che contribuisce alla stabilizzazione e al ripiegamento dei substrati in associazione con il loro co-chaperone HSP40s. Nell'uomo ci sono 11 geni che codificano per i membri della famiglia delle HSPs70 che include un membro costitutivo citosolico heat shock chiamato HSC70, HSP70 che è il membro citosolico stress indotto, la proteina 78 (Grp78) localizzata nel reticolo endoplasmatico, glucosio-regolata e la mitocondriale Grp75 (Muchowski and Wacker 2005). HSP40 lega HSP70 e promuove l'idrolisi dell'ATP, conducendo ad uno "switch" conformazionale a cui segue la cattura dei substrati proteici non-nativi (Minami, Hohfeld et al. 1996). Le small heat shock protein (smHSP) si assemblano in grandi strutture oligomeriche e posseggono un dominio N-terminale α -cristallino che media l'assemblamento di forme oligomeriche (Haley, Horwitz et al. 1998).

L'espressione delle smHSP, specialmente della smHSP27, e della HSP70 aumenta la sopravvivenza delle cellule dei mammiferi esposte a diversi tipi di stimoli che inducono stress ed apoptosi. Le smHSP27 e HSP70 antiapoptotiche sono abbondantemente espresse nei tumori umani maligni (Jaattela 1999). Inoltre le HSP sono anche coinvolte nello sviluppo e nella progressione del cancro. E' stato dimostrato che esse sono overesprese nel tessuto tumorale e nelle linee cellulari tumorali (Garcia-Bermejo, Vilaboa et al. 1997; Lim, Park et al. 2005; Wang, Wang et al. 2010). L'overespressione delle HSP risulta una protezione per le cellule del tumore ed inibisce l'apoptosi (Wei, Zhao et al. 1995; Nylandsted, Rohde et al. 2000; Schmitt, Maingret et al. 2006). Quindi la famiglia delle HSPs può essere associata con lo sviluppo del cancro (Jin and Ringertz

1990; Young and Hartl 2002). Ad esempio HSP 60 è overespressa nell'adenocarcinoma gastrico, nel cancro epatico e nel carcinoma della vescica. HSP70 è overespressa nel cancro gastrico, nel carcinoma epatocellulare e nell'astrocitoma (Costa, Rosas et al. 1997). Recenti studi (Zhang, Gao et al. 2009) hanno dimostrato che HSP70, 60 e 90-alfa sono altamente espresse nel cancro colo-rettale, in quanto queste tre proteine giocano un ruolo generale nello sviluppo del cancro e nei meccanismi tipici della cellula tumorale: metabolismo, proliferazione, apoptosi e immunità tumorale.

Struttura delle HSPs

Dell'intera famiglia delle HSPs, dati strutturali sono disponibili solo per HSP70 e HSP90. HSP 90 ha tre domini strutturali: 1) un dominio N-terminale nucleotide binding (NDB) che può legare anche gli inibitori di HSP90 ed i peptidi (Prodromou, Roe et al. 1997; Vogen, Gidalevitz et al. 2002); 2) un segmento intermedio che interagisce con le proteine bersaglio; 3) il C-terminale che è implicato nell'omodimerizzazione (Prodromou, Roe et al. 1997). Invece HSP70 ha due domini: un NBD e un dominio di legame per il substrato, indicato come SBD. L'estremità N-terminale, di 44 KDa, del NBD ha un'attività ATPasica. L'estremità C-terminale, di 27KDa, è composto da SBD e da una regione "lid" (Rudiger, Buchberger et al. 1997). Questi due domini sono connessi tra di loro da una regione linker conservata, di cui, recentemente, è stato dimostrato il ruolo critico nella comunicazione tra i domini. HSP70 interagisce in modo preferenziale con catene polipeptidiche non ripiegate e non con le proteine in forma nativa, con un'eccezione per quanto concerne l'oncosoppressore p53 (Pinhasi-Kimhi, Michalovitz et al. 1986). All'interno di una catena polipeptidica non ripiegata, HSP70 lega una corta sequenza peptidica che comprende un core di cinque residui idrofobici fiancheggiato da residui basici. Queste sequenze si alternano ogni 30-40 residui in molte proteine ma non nelle forme native delle proteine dove sono inaccessibili all'azione di HSP70. Alcune informazioni si hanno anche sulla struttura delle small shock proteins (smHSPs), le quali presentano un dominio alfa-cristallino conservato (Ingolia and Craig 1982). Questo dominio è preceduto da un dominio N-terminale, che è altamente variabile nella sequenza e nella lunghezza, ed è seguito da una sequenza C-terminale corta e poco conservata. Alcuni geni delle smHSPs contengono un introne che delinea i domini N-terminale e alfa-cristallino (Russnak and Candido 1985) e studi strutturali supportano l'ipotesi secondo cui la struttura di questi due domini (Wistow 1985; Carver, Aquilina et

al. 1993) consiste generalmente di foglietti-beta. Una caratteristica comune delle smHSP è quella di formare dei grandi complessi oligomerici.

Induzione delle HSP




Una delle caratteristiche delle HSPs, essenziale per la sopravvivenza della cellula sottoposta a stress, è l'inducibilità.

L'induzione delle HSPs è regolata dalla famiglia degli HSF che legano gli heat shock element (HSE) presenti su ogni gene che codifica per le heat shock protein (Pirkkala, Nykanen et al. 2001). Nei mammiferi esistono quattro HSF (HSF 1,2,4 e HSFY). HSF1 è stato ben studiato ed è stato osservato che viene trascritto in risposta allo shock termico e in seguito ad altri stress. Esso adempie a funzioni citoprotettive e antiapoptotiche (Kline and Morimoto 1997). In condizioni non stressanti HSF1 esiste come monomero inattivo regolato negativamente in associazione con due HSP (90 e 70). Dopo alcuni minuti dall'esposizione della cellula allo stress termico e/o altri stress, HSF1 è attivato attraverso diversi processi. Primo, si dissocia dalle HSPs, trimerizza e trasloca nel nucleo. Poi, HSF1 viene fosforilato su siti multipli e lega con alta affinità gli heat shock elements che sono localizzati nella regione del promotore del gene target inducendo la trascrizione di tale gene (Shi, Mosser et al. 1998).

Si sa che HSF1 è costitutivamente fosforilato sulla Ser 303 da GSK-3, sulla Ser 307 da ERK e sul residuo della Ser 308 (Chu, Zhong et al. 1998), queste modifiche sembrano importanti per la regolazione negativa di HSF1; mentre un altro sito, la Ser 230, è fosforilata dalla proteina chinasi II calcio/caldimodulina-dipendente. Le fosforilazioni delle Ser 326 e 419, che sono fosforilate da polo-like chinasi I, sono importanti in quanto promuovono l'attività di HSF1 (Guettouche, Boellmann et al. 2005). Quando le cellule esprimono molti chaperoni come HSP 70 e 90, HSF1 interagisce con essi ed è regolato negativamente con un controllo a feedback. Quindi le cellule hanno questi meccanismi complessi per regolare l'espressione degli chaperoni i quali permettono di proteggerle da vari stress.

Capitolo 3

Organismi Modello & Teratogenesi Comparata

-  Anatomia comparata ed evoluzione
-  Gli organismi modello
-  Teratogenesi comparata

3 Anatomia comparata ed evoluzione

Gli organismi viventi, dai più semplici ai più complessi, presentano processi biologici sostanzialmente simili, anche quando sono separati da una significativa distanza evolutiva. Il motivo di questa omogeneità sta proprio nell'origine comune della vita e nel mantenimento, nel corso dell'evoluzione, di alcuni processi biologici fondamentali come il metabolismo, la regolazione del ciclo cellulare e lo sviluppo embrionale. Questi processi sono finemente orchestrati da una serie di geni che hanno una controparte ortologa nelle diverse specie. Secondo la *teoria dell'evoluzione*, infatti, la diversità biologica potrebbe essersi originata a partire da un singolo progenitore ancestrale nel corso della storia della terra dal quale si sono separate poi, mediante il processo della *speciazione*, milioni di specie che attualmente vivono sul nostro pianeta. L'evoluzione è un processo conservativo, e la selezione naturale agisce sulla modifica di strutture preesistenti piuttosto che iniziare dal nulla, motivo per cui l'evoluzione di nuove caratteristiche spesso non richiede la comparsa di nuovi geni che regolano lo sviluppo, ma si basa sulla modifica di geni già esistenti (Hartl and Clark 2007). Nuovi disegni derivano quindi da strutture già esistenti, e un cambiamento nella struttura di base di un organismo può provocare la formazione di qualcosa di unico, come le ali degli insetti, i fiori delle piante e le penne degli uccelli. Queste novità evolutive sono variazioni di una struttura che originariamente svolgeva una determinata funzione, e che in seguito è stata modificata in modo da risultare adattativa per uno scopo diverso. Le penne, ad esempio, che si sono evolute dalle squame dei rettili, hanno fornito isolamento termico agli uccelli primitivi e ad alcuni dinosauri, ma rappresentano anche un pre-adattamento al volo. Questi cambiamenti evolutivi hanno avuto origine principalmente da variazioni verificatesi durante lo sviluppo: in questo periodo, infatti, i geni regolatori esercitano il proprio controllo su centinaia di altri geni, e cambiamenti anche piccoli, in questi geni regolatori, possono causare cambiamenti strutturali di grande entità nell'organismo. Altri cambiamenti evolutivi, come la perdita degli arti nei serpenti, avvengono come il risultato di cambiamenti nei geni che influenzano la corretta serie di eventi durante lo sviluppo. Nel pitone, ad esempio, la perdita degli arti e l'allungamento del corpo sono associati a mutazioni nei diversi geni *Hox*, che influenzano l'espressione dello schema corporeo e la formazione degli arti in una grande varietà di specie (Hartl and Clark 2007). Questi geni omeotici individuati in *Drosophila* hanno suscitato molto interesse, poiché in breve tempo si è scoperto che sono altamente conservati e che geni simili sono

presenti nel genoma di tutti i Metazoi, anche in quelli evolutivamente molto lontani, come ad esempio i funghi e le piante. Questo indica che questi geni hanno origini comuni. Lappin e coll. (Lappin, Grier et al. 2006) hanno ipotizzato che il primo gene *Hox ancestrale* si sarebbe originato circa un miliardo di anni fa, e successivamente si sarebbe duplicato formando 2 geni *protohox*, i quali, mediante processi di divergenza e duplicazione, si sarebbero organizzati in caratteristici cluster. Nei vertebrati, l'intero complesso ancestrale sarebbe andato incontro ad ulteriori duplicazioni che avrebbero portato alla formazione di quattro complessi indipendenti, molto simili tra loro (Kappen, Schughart et al. 1989). La profonda omologia e le caratteristiche di espressione dei geni Hox/Hom riflettono l'alto grado di conservazione della funzione di queste proteine anche in specie filogeneticamente distanti (Lappin, Grier et al. 2006). Questi geni condividono, infatti, un ruolo fondamentale nel controllo della morfogenesi precoce e, in particolare, nella specificazione dell'identità regionale lungo l'asse antero-posteriore. Quella dei geni *Hox* è solo una delle evidenze scientifiche che dimostrano inequivocabilmente che lo sviluppo di animali diversi è controllato dagli stessi geni. Quindi, è possibile tracciare un filo conduttore, costellato di innumerevoli analogie a livello genico e molecolare, che accomuna tutte le specie viventi dai batteri all'uomo, ed è proprio grazie a queste similitudini che è possibile utilizzare nella ricerca biologica un numero relativamente ristretto di organismi a cui si dà il nome di *organismi modello*.

3.1 Gli Organismi Modello

La storia della scienza ed in particolare quella della biologia è stata continuamente contraddistinta dalla ricerca degli strumenti più adatti per affrontare l'indagine scientifica. Molto spesso per comprendere un problema complesso è utile scegliere ed utilizzare un "modello" più semplice nel quale il fenomeno biologico da indagare si presenti in modo particolarmente "puro" ed esemplare. I risultati ottenuti saranno poi estrapolati e verificati in contesti più complessi. Le conoscenze che derivano dallo studio degli organismi modello possono, quindi, portare alla comprensione di principi generali applicabili a molte specie, uomo compreso. Il continuo intreccio tra semplicità e complessità, tra strutture e relazioni, che si realizza in tal modo consente alle conoscenze scientifiche di progredire. La storia degli organismi modello risale alla prima metà del 1800, quando Gregor Mendel utilizzò una comune pianta coltivata, *Pisum sativum* (pisello), per individuare le modalità di trasmissione dei caratteri ereditari

condivise da tutti gli organismi a riproduzione sessuata. Anche altri pionieri della genetica si servirono di organismi modello: a fine '800 Hugo de Vries scoprì il fenomeno delle mutazioni in *Oenothera lamarckiana* (rapunzia), seguito dopo un decennio da Thomas H. Morgan, che rese celebre il moscerino della frutta (*Drosophila melanogaster*) grazie a studi tesi a discriminare i caratteri legati a sesso e con l'individuazione dei cromosomi come substrato fisico della trasmissione ereditaria. Da allora la "schiera" degli organismi modello si è arricchita di molti protagonisti, provenienti da tutti i Phyla. Dai piselli di Mendel, alle uova e agli embrioni degli Anfibi (*Xenopus levis*) e del riccio di mare (*Paracentrotus lividus*), dall'assone gigante del calamaro (*Loligo paeleii*), alle ghiandole salivari della *Drosophila melanogaster*, e ancora, dal sistema immunitario del topo (*Mus musculus*) al sistema nervoso del mollusco (*Aplysia*), la biologia moderna è progressivamente cresciuta basandosi proprio sui sistemi modello.

Per essere un "buon modello" per la ricerca sperimentale, un organismo animale o vegetale deve presentare alcune caratteristiche particolari:

- Semplicità di coltivazione, o allevamento, nonché di manutenzione in laboratorio
- Bassi costi di gestione
- Piccole dimensioni
- Ciclo vitale relativamente breve
- Rapida riproduzione
- Generazione di prole numerosa
- Disponibilità di dati genetici e molecolari
- Facilità di manipolazioni genetiche

Nonostante questi tratti comuni, alcuni organismi modello presentano delle peculiarità che li rendono più idonei, rispetto ad altri organismi, per una particolare linea di ricerca; ragion per cui molti laboratori effettuano esperimenti in parallelo con due o più tipi di organismo modello per comprendere i diversi aspetti di uno stesso processo biologico.

Ad esempio il teleosteo *Danio rerio* produce degli embrioni di grandi dimensioni e trasparenti, ottimi oggetti di ricerca per i biologi dello sviluppo; la *Drosophila* è generalmente utilizzata per gli studi di genetica, in quanto si possono seguire facilmente nel corso delle generazioni successive gli effetti delle mutazioni genetiche indotte. Il nematode *Caenorhabditis elegans*, un organismo costituito da poco

più di 1000 cellule, è in buona parte utilizzato in studi di genetica dello sviluppo in quanto il suo esiguo numero di cellule ha consentito di ricostruire, a partire dallo zigote, l'intera discendenza cellulare, permettendo di trarre una serie di conclusioni in merito a uno dei temi centrali della biologia dello sviluppo: il differenziamento cellulare e la sua determinazione progressiva. Il riccio di mare *Paracentrotus lividus* è da sempre usato nei laboratori di ricerca per lo studio dei meccanismi connessi all'interazione fra gameti e, più in generale, per lo studio dello sviluppo embrionale.

Tutti gli organismi usati permettono di introdurre ed approfondire lo studio delle caratteristiche anatomiche di invertebrati o vertebrati, del dimorfismo sessuale, della fecondazione, dell'embriogenesi e del ciclo vitale; ed ancora delle variazioni della durata del ciclo vitale o dell'embriogenesi o della prolificità in relazione al variare di fattori ambientali quali la temperatura o la quantità di cibo, inoltre offrono fertili spunti per lo studio della genetica, delle mutazioni, delle malattie genetiche o della terapia genica e delle sue implicazioni in bioetica.

3.2 Teratogenesi Comparata

La possibilità di disporre di organismi sperimentali appartenenti a specie differenti tra loro, ha consentito di effettuare analisi comparative e di comprendere quindi quali stress determinano la stessa risposta negli embrioni di tutte le specie analizzate e quali invece inducono risposte specie-specifiche. E' ormai chiaro che i geni responsabili del controllo delle prime fasi dell'embriogenesi sono molto conservati nell'ambito di un *Phylum*, facendo quindi presumere una comparabile conservazione anche dei meccanismi che determinano la teratogenesi per specifici stress. In particolare le sostanze chimiche o fattori fisici ambientali potrebbero avere un effetto teratogeno agendo a differenti livelli: ad esempio interferendo con l'attività di proteine coinvolte nelle vie di trasduzione dei segnali che attivano la regolazione dell'espressione dei geni dello sviluppo, oppure alterando le concentrazioni fisiologiche dei morfogeni (molecole che organizzano lo schema spaziale del differenziamento cellulare, tramite variazioni nelle proprie concentrazioni). Se gli studi di genetica dello sviluppo hanno permesso l'affermarsi di un nuovo tipo di embriologia comparata, che ha evidenziato che embrioni appartenenti a classi diverse hanno geni regolatori comuni conservati (per esempio i geni Hox), merita considerazione anche la possibilità di una teratologia comparata, basata sul confronto delle variazioni, dovute all'ambiente, dei pattern di espressione genica e dei loro effetti sul fenotipo nelle varie classi di vertebrati.

La moderna teratologia dello sviluppo può avvalersi, pertanto, di un approccio multidisciplinare: partendo da evidenze morfologiche, mediante l'analisi dell'espressione di geni e proteine, è possibile studiare l'intera patogenesi della malformazione embrionale. I fattori esogeni ritenuti teratogeni possono intervenire sull'omeostasi cellulare con effetti negativi sulla stabilità del genoma, sino ad interferire, a differenti livelli, con i meccanismi che regolano l'espressione genica. Nell'ambito dell'embriogenesi sperimentale risulta quindi interessante caratterizzare dal punto di vista molecolare la risposta dell'organismo a differenti fattori di stress. Questi ultimi, infatti, possono essere utilizzati come strumento d'indagine in grado di causare malformazioni macroscopiche, da cui derivare i meccanismi molecolari e cellulari responsabili dell'effetto biologico avverso osservato.

La teratologia comparata, pertanto, può risultare utile per determinare:

- Il ruolo di geni specifici nello sviluppo normale e in quello patologico
- La via patogenetica correlata all'esposizione ad un determinato agente stressorio
- La reale possibilità che vertebrati appartenenti a classi diverse seguano le stesse vie embriogenetiche e teratogenetiche.

Capitolo 4

Scopo della ricerca & Sistemi Biologici



Scopo della ricerca



I° Sistema biologico: *Danio rerio*

- Gli ittiopsidi
- *Danio rerio*
- Sviluppo embrionale di *Danio rerio*



II° Sistema biologico: *Podarcis sicula*

- I rettili
- *Podarcis sicula*
- Sviluppo embrionale di *Podarcis sicula*

4 Scopo della ricerca

Diversi studi bibliografici dimostrano che organismi appartenenti a specie diverse, dalle piante ai vertebrati, sottoposti a vari tipi di stress - chimici, fisici o biologici - presentano variazioni nell'espressione degli stessi trascritti o di trascritti codificanti per proteine con funzioni simili (Meistertzheim, Tanguy et al. 2007; Tessitori, Maria et al. 2007; Lee, Kim et al. 2008). Partendo dal presupposto che differenti agenti stressori di natura esogena alterino in egual misura il fisiologico sviluppo embrionale, è ragionevole ipotizzare che vi sia un meccanismo conservato nel corso dell'evoluzione, mediante il quale "batterie" di geni esecutori - responsabili del fenotipo osservato - sono regolati e coordinati dall'espressione espletata a monte da geni "master" regolatori. In tale ambito di ricerca si inserisce il mio progetto di tesi: uno studio mirato a definire il profilo molecolare dei geni associati alle alterazioni morfologiche indotte da stress durante lo sviluppo embrionale di Vertebrati non Mammiferi. A tale scopo è stato condotto uno studio comparato tra due sistemi biologici: l'Ittiopside *Danio rerio* e il Tetrapode oviparo *Podarcis sicula*. Questi organismi, entrambi vertebrati, sono collegati da un punto di vista filogenetico, quindi è plausibile che utilizzino le stesse vie metaboliche e gli stessi pathway molecolari per espletare le medesime funzioni cellulari; al contempo essendo un organismo acquatico l'uno e terrestre l'altro è implicito che abbiano evoluto differenti meccanismi adattativi, atti alla sopravvivenza ed alla riproduzione.

Nel corso degli esperimenti, gli embrioni di entrambi gli organismi sono stati sottoposti a due tipi di stress: uno shock termico (repentino abbassamento della temperatura), ed uno chimico, (esposizione al Cadmio).

Gli agenti stressori costituiscono uno strumento d'indagine in grado di indurre alterazioni morfologiche, da cui partire per poi giungere a ritroso ad individuare i meccanismi molecolari più precoci di risposta cellulare.

Gli obiettivi di questo lavoro sono, pertanto, di:

- Verificare se lo stesso tipo di stress, sia esso chimico (il cadmio) o fisico (il freddo), induce lo stesso tipo di alterazioni, sia morfologiche che molecolari, in due diversi organismi, *Danio rerio* e *Podarcis sicula*.
- Verificare se diversi tipi di stress, il cadmio e il freddo, inducono le stesse alterazioni, sia morfologiche che molecolari, nel medesimo organismo (*Danio rerio* o *Podarcis sicula*).

4.1 I° Sistema biologico: *Danio rerio*

○ 4.1.1 Gli ittiopsidi

Gli Ittiopsidi, indicati con il termine generico di pesci, costituiscono una classe comprendente circa 32000 specie viventi, che nel loro insieme coprono quasi il 50% del totale delle specie dei Vertebrati (Helfman 2009). Gli Ostracodermi, la prima classe di vertebrati apparsi sulla Terra, hanno avuto origine nel Periodo Cambriano - circa 510 milioni di anni fa - e si sono estinti alla fine del Devoniano - circa 350 milioni di anni fa. Questi Ittiopsidi erano pesci d'acqua dolce sprovvisti di mascelle. I primi pesci dotati di mascelle, gli Acanthodi, sono apparsi nel tardo Siluriano - circa 410 milioni di anni fa - e si sono estinti prima della fine del Permiano - circa 250 milioni di anni fa. Gli Acanthodi erano pesci dalle piccole dimensioni ed erano sia organismi filtratori che predatori, provvisti di denti simili agli squali. Una delle ipotesi più accreditate è che i pesci ossei moderni, gli Osteitti, si siano evoluti direttamente dagli Acanthodei, o che condividano con essi un antenato comune. Probabilmente le prime forme di Osteitti - apparsi nel tardo Siluriano o all'inizio del Devoniano, ovvero circa 395 milioni di anni fa - erano d'acqua dolce; tale ipotesi è avvalorata dall'assenza di resti fossili marini di pesci ossei risalenti a periodi antecedenti al Triassico - circa 230 milioni di anni fa. I Placodermi, un altro gruppo di pesci provvisti di mascella, sono apparsi all'inizio del Devoniano - circa 395 milioni di anni fa - e si sono estinti tra la fine del Devoniano e l'inizio del Carbonifero - circa 345 milioni di anni fa. I Placodermi erano piccoli, appiattiti e abitavano le profondità marine. La mascella superiore era saldamente fusa al cranio, ma c'era un giunto a cerniera tra il cranio e la placca ossea della regione del tronco. Si ritiene che gli attuali pesci cartilaginei, i Condroitti, come squali e razze discendano da questi pesci primitivi. Gli antenati dei Vertebrati terrestri si trovano tra gli Osteitti, nella sottoclasse dei Sarcopterigi - caratterizzati da narici interne e pinne carnose chiamate lobi - apparsi nel tardo Siluriano o all'inizio del Devoniano - oltre 390 milioni di anni fa. I Sarcopterigi includono un gruppo noto come Crossopterigi, che ha un unico rappresentante vivente, il celacanto *Latimeria*. Probabilmente, durante il Periodo Devoniano, proprio dai Crossopterigi, in particolare dall'ordine Ripidistia, sono derivate le forme che "strisciando" fuori dall'acqua hanno dato origine ai primi Anfibi.

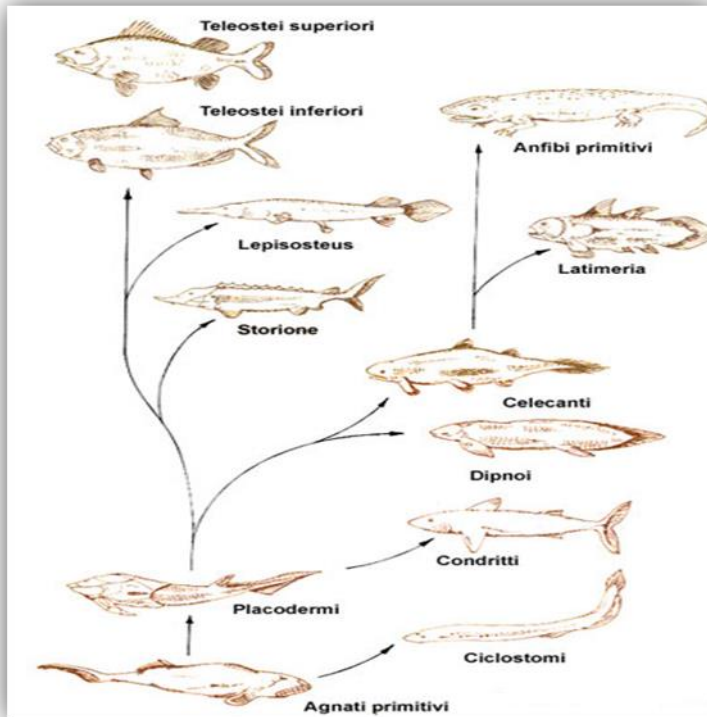


Figura 4.1: Albero evolutivo dei pesci

Gli Ittiopsidi si distinguono tra i vertebrati per il lungo periodo di evoluzione che ne ha consentito la diversificazione in tutte le forme attuali, sviluppate e adattate a molteplici tipi di condizione e alimentazione, specializzandosi e occupando quasi tutte le nicchie ecologiche dei vari ambienti acquatici. Gli ambienti a salinità variabile, come gli estuari dei fiumi e le lagune, accolgono esemplari, detti *eurialini*, specializzati nel

soportare sbalzi, anche notevoli, nella concentrazione del sale disciolto; al contrario le specie incapaci di tollerare gli ambienti con salinità variabile sono le *stenoaline*. L'*habitat* nel quale la specie è stanziata e il tipo di alimentazione adottato hanno plasmato, durante l'evoluzione, il corpo dei pesci, rendendoli estremamente diversificati. In generale la forma del loro corpo, adatta alla vita acquatica, è idrodinamica. La maggior parte dei pesci sono organismi ectotermi, ovvero non sono in grado di regolare la loro temperatura corporea, che quindi è dipendente da quella dell'ambiente che li circonda. Alcuni, tuttavia, possono essere considerati endotermi, ovvero capaci in un certo qual modo di regolare la loro temperatura corporea, che risulta, pertanto, diversa da quella esterna. Tutti i teleostei endotermi sono membri della famiglia degli Scombridae (Helfman 2009). L'endotermia è mantenuta mediante la ritenzione del calore generato dall'apparato muscolare durante il nuoto, e permette a questi pesci di accrescere la forza contrattile dei muscoli stessi, di aumentare la velocità di elaborazione del sistema centrale e della digestione (Helfman 2009). Le specie che non necessitano di forme e colorazioni mimetiche presentano colori vivaci atti a comunicare particolari condizioni. Questa caratteristica, conosciuta come aposematismo, comune ad altre classi animali, è sfruttata anche come meccanismo di difesa: i pesci velenosi, ad esempio, sono intensamente colorati, al fine di segnalare ad eventuali predatori la loro pericolosità. Altro caso è il dimorfismo sessuale, accentuato soprattutto nel periodo

riproduttivo, quando i maschi assumono una colorazione più vivace per impressionare maggiormente le femmine ed aumentare la propria *fitness riproduttiva*. La maggior parte delle specie è ovipara e produce un numero cospicuo di uova, che dopo la deposizione vengono disperse casualmente in mare, altre costruiscono un nido dove riporle o le ricoprono di sedimenti per sottrarle alla predazione. Solo poche specie adottano delle cure parentali proteggendo il nido. Alcuni Condroitti, come gli squali, ma anche alcuni Osteitti, come i celacanti, presentano fecondazione interna e sono vivipari (Helfman 2009). La maggior parte delle specie di Ittiopsidi presenta sessi separati, anche se vi sono alcuni esemplari di teleostei ermafroditi, ad esempio, tra i serranidi è presente l'ermafroditismo sincrono, fenomeno nel quale le gonadi maschili e femminili si sviluppano contemporaneamente, mentre in altri pesci le gonadi si sviluppano in tempi successivi – si parla in questo caso di ermafroditismo consequenziale – e ciò comporta l'inversione sessuale.

○ 4.1.2 *Danio rerio*

Classificazione

Phylum: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordine: Cypriniformes

Famiglia: Cyprinidae

Sottofamiglia: Danioninae

Genere: *Danio*

Specie: *Danio rerio*



Figura 4.2: Esemplare adulto di *Danio rerio*

Danio rerio, conosciuto comunemente come *Zebrafish*, è un piccolo pesce d'acqua dolce, appartenente alla famiglia Cyprinidae. È un pesce tropicale principalmente diffuso in Asia (Pakistan, India, Bangladesh e Nepal), e abita le acque correnti o stagnanti, le risaie, i canali ed i ruscelli. Inoltre, sono state scoperte piccole popolazioni anche in Colombia, probabilmente nate da introduzioni di allevamenti locali. La lunghezza media degli individui adulti è tra i 4-6 cm, presentano dimorfismo sessuale in quanto il corpo affusolato è più formoso nelle femmine che nei maschi. La livrea prevede una base argentea o dorata, un dorso verde-olivastro e un ventre bianco argenteo. I fianchi sono un'alternanza tra decise linee orizzontali chiare e linee scure blu; queste linee percorrono orizzontalmente tutta la lunghezza del corpo dalla testa alla pinna caudale.

La coda e la pinna anale sono striate di bianco e di blu, la dorsale è blu orlata di bianco, le altre pinne sono olivastre e le pinne pelviche sono senza disegni mentre nella pinna anale e su quella caudale il disegno a righe continua. La bocca è rivolta in alto e presenta dei barbigli utilizzati per procacciare il cibo. Nel periodo riproduttivo la femmina sviluppa una forma notevolmente appesantita dalle 300-400 uova che, dopo un vivace corteggiamento del maschio, deporrà su una superficie fogliare. In circostanze di particolare stress può capitare che *Danio* mangi le proprie uova. L'alimentazione è molto variegata, composta principalmente da larve d'insetti, piccoli crostacei e vermi. La somiglianza dei programmi di sviluppo in tutti i vertebrati ha conferito a *Danio rerio* un ruolo centrale per lo studio di geni che agiscono nello sviluppo umano. Ad esempio, il gene *mariner* di *Danio* codifica per la proteina miosina VIIA, che si trova nella vescicola otica: mutazioni di questo gene portano ad un danneggiamento delle capacità uditive, impedendo la corretta formazione delle cellule sensoriali della vescicola otica. Allo stesso modo, nell'uomo, individui con un'alterazione del gene codificante per la miosina VIIA presentano una sindrome di sordità congenita (Ernest, Rauch et al. 2000). Un'altra caratteristica che ha reso *D. rerio* uno degli organismi di studio preferiti dai biologi dello sviluppo è la sensibilità dei suoi embrioni alle molecole antisense morfoliniche (Zhong, Childs et al. 2001): i ricercatori possono utilizzare questo sistema per verificare se un particolare gene è necessario per una particolare funzione. Un'altra caratteristica degli embrioni è che sono permeabili a piccole molecole disciolte in acqua, ciò consente di saggiare l'effetto di sostanze che possono essere dannose per lo sviluppo, come ad esempio l'etanolo o l'acido retinoico (Blader and Strahle 1998) oppure il cloruro di cadmio, come dimostrato anche in questo lavoro di tesi.

○ 4.1.3 Sviluppo embrionale di *Danio rerio*

Le uova deposte di *D. rerio* sono ovociti bloccati in metafase della seconda divisione meiotica, circondate da un corion e ricche di vitello distribuito in modo omogeneo in tutto il citoplasma (uova telolecitiche). Lo spermatozoo passa attraverso il micropilo, un canale che decorre nel corion in corrispondenza del futuro polo animale, che si oblitererà dopo l'ingresso del gamete maschile nell'uovo. La fecondazione causa il completamento della meiosi e l'espulsione del secondo globulo polare. Dopo circa 10 minuti, si comincia a manifestare un fenomeno che si protrarrà durante le fasi iniziali della segmentazione e che consiste nella formazione del blastodisco ovvero di una zona di citoplasma priva di tuorlo situata al polo animale dello zigote.

Segmentazione

La grande quantità di vitello presente nel citoplasma dell'uovo condiziona le modalità di segmentazione, la quale avviene esclusivamente a livello del blastodisco e risulta essere, pertanto, meroblastica discoidale.

Lo sviluppo è molto rapido e le prime divisioni di segmentazione seguono un modello riproducibile di divisioni meridiane ed equatoriali della durata di circa 15 minuti ciascuna. Le prime 12 divisioni sono sincrone e formano un piccolo cumulo di cellule situato al polo animale, al di sopra di una grande cellula del vitello. Queste cellule costituiscono il blastoderma; inizialmente tutte le cellule mantengono connessioni l'una con l'altra e con la sottostante cellula del vitello, formando un sincizio, cosicché molecole di piccole dimensioni possono diffondere liberamente tra i blastomeri

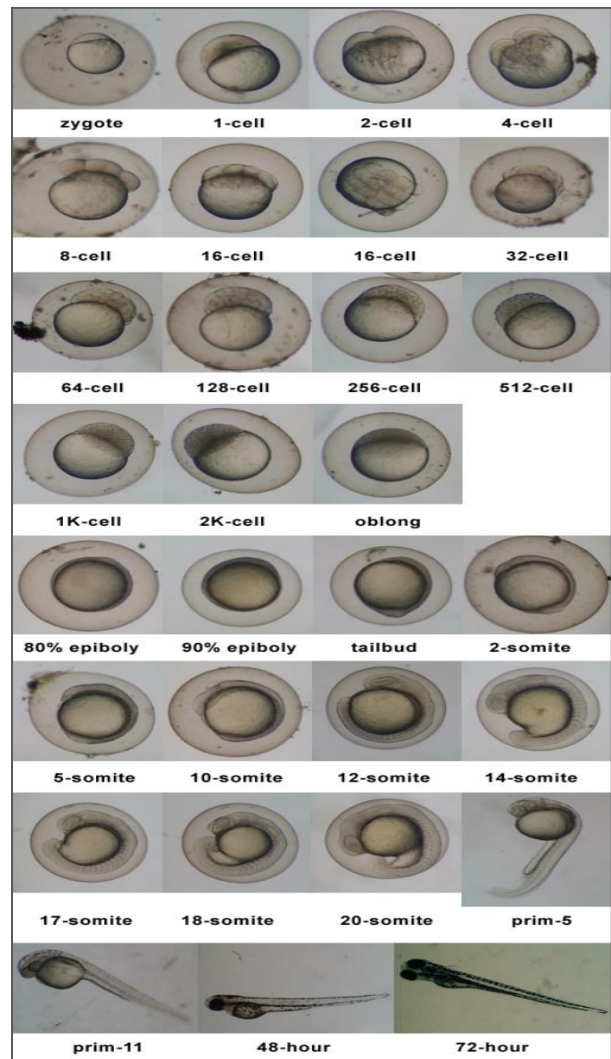


Figura 4.3: Sviluppo embrionale di *Danio rerio*

(Kimmel and Warga 1988). A partire dalla decima divisione, si ha la *transizione della blastula intermedia*: inizia ovvero la trascrizione dei geni zigotici, con conseguente rallentamento delle divisioni cellulari e perdita della sincronia, inoltre risulta evidente il movimento delle cellule (Kane and Kimmel 1993). Da questo stadio possiamo distinguere tre popolazioni cellulari divise, disposte in tre strati:

- Strato sinciziale vitellino (*YSL, Yolk Syncytial Layer*): si formano tra la nona e la decima divisione, allorché le cellule al margine vegetativo del blastoderma si fondono con la sottostante cellula del vitello.
- Strato di rivestimento (*EVL, Enveloping Layer*): è costituito dalle cellule più superficiali del blastoderma, che formano una lamina epiteliale monostratificata.

- Strato di cellule profonde: si trovano tra i due strati precedentemente descritti e danno origine all'embrione vero e proprio.

Gastrulazione

Nella gastrulazione dei pesci il primo movimento cellulare è l'epibolia delle cellule del blastoderma al di sopra del vitello. Nella fase iniziale di questo movimento le cellule profonde del blastoderma si spostano verso l'esterno, intercalandosi alle cellule più superficiali (Warga and Kimmel 1990). Successivamente, questa concatenazione di cellule si sposta verso il polo vegetativo, sulla superficie del vitello. Dopo che le cellule del blastoderma hanno ricoperto circa metà della cellula del vitello, si ha un ispessimento di tutto il margine del blastoderma che attua l'epibolia. Tale ispessimento è detto *anello germinativo*, ed è costituito da uno strato superficiale, l'*epiblasto*, e da uno strato profondo, l'*ipoblasto*. Le cellule di questi due strati andranno poi ad intercalarsi nel futuro lato dorsale dell'embrione, formando lo scudo embrionale. Le cellule dello scudo embrionale saranno, poi, interessate da fenomeni di estensione e convergenza, che porteranno alla formazione del cordomesoderma, il precursore della notocorda.

Come il labbro dorsale del blastoporo negli anfibii, lo scudo embrionale forma la placca precordale e la notocorda dell'embrione in via di sviluppo; i precursori di queste due regioni sono responsabili dell'induzione dell'ectoderma neurale.

4.2 Il sistema biologico : *Podarcis sicula*

○ **4.2.1 I Rettili**

I Rettili (dal latino *repto*= striscio) costituiscono una classe comprendente circa 6000 specie viventi, costituita in prevalenza da serpenti e lucertole, presenti in Europa con circa 90 specie (Harris and Turner 2002). Oltre a questi, vi sono anche testuggini, tartarughe, coccodrilli, alligatori e il tuatara della Nuova Zelanda, forse il rettile vivente più antico.

I Rettili comparvero nel Carbonifero - circa 280 milioni di anni fa - con una specie morfologicamente ed etologicamente simile alle moderne lucertole, l'Ilonomo *Hylo* che costituisce il più antico fossile di rettile ritrovato. I progenitori di questa lucertola estinta sono da ricercare in un gruppo di Stegocefali o meglio Labirintodonti, grossi Anfibi che nel Devoniano abbandonarono l'acqua.

Nella storia evolutiva dei Vertebrati, i Rettili occupano un posto di primaria importanza perché furono le prime forme strettamente terrestri che diedero origine a diverse linee evolutive che hanno portato alla genesi dei Testudinati, dei Mammiferi e degli Uccelli.

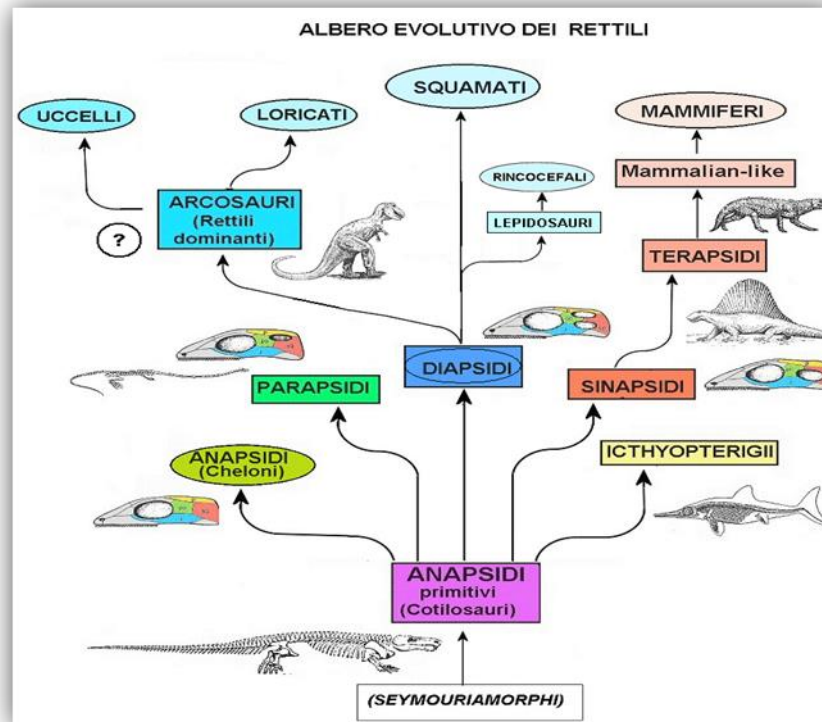


Figura 4.4: Albero evolutivo dei rettili

La definitiva conquista dell'ambiente terrestre da parte dei Rettili fu favorita da due innovazioni rispetto agli Anfibi; la prima consiste nella corneificazione degli strati epidermici della pelle, che protegge gli adulti dall'essiccamento. Nell'epidermide, oltre allo strato corneo, si formano anche le squame, che nella loro struttura più semplice hanno forma romboidale, ma in alcuni casi possono essere irrobustite da formazioni ossee, come nei coccodrilli; la disposizione delle squame varia nelle diverse specie ed assume un notevole valore per la classificazione sistematica. L'altra grande innovazione consiste nello sviluppo di un uovo con un annesso embrionale, l'*amnios*, capace di proteggere l'embrione dall'essiccamento. I rettili sono organismi ectotermi e accumulano calore, e quindi energia, nei tessuti mediante la diretta esposizione al sole o a superfici riscaldate. Questa caratteristica influenza notevolmente l'areale di distribuzione mondiale dei Rettili, i quali sono presenti in tutte le regioni temperate e tropicali del mondo, ma raramente in quelle molto fredde. L'ectotermia ha il vantaggio evolutivo di un limitato consumo energetico corporeo, in relazione al rapporto

superficie/volume dell'animale, permettendo così il mantenimento di tutte le funzioni vitali con limitate quantità di cibo ingerito. Respirazione di tipo polmonare, circolazione doppia ed incompleta, presenza di scheletro completamente ossificato, arti a funzione deambulante in alcune specie, a funzione natatoria (a forma di palette) nei Testudinati e ridotti o del tutto assenti in alcuni Squamati completano le caratteristiche distintive dei Rettili. Infine il mimetismo è tra le più affascinanti particolarità di questo gruppo, permettendo ad alcune specie di cambiare repentinamente colore in funzione dell'ambiente e delle strategie di sopravvivenza, diventando fondamentale in una serie di processi biologici vitali come riproduzione e interazione preda-predatore. La maggior parte dei Rettili sono ovipari, ma ci sono specie ovovivipare ed alcune anche vivipare; nelle prime le uova fecondate compiono e completano lo sviluppo all'interno dell'ovidotto, nelle specie vivipare le pareti della parte mediana dell'ovidotto formano pieghe ricche di vasi capillari che comunicano con i vasi sanguigni dell'embrione (Shine 2005).

○ 4.2.2 *Podarcis sicula*

Classificazione:

Phylum: Chordata

Classe: Rettili

Ordine: Squamati

Sottordine: Sauri

Famiglia: Lacertidi

Genere: *Podarcis*

Specie: *Podarcia sicula*



Figura 4.5 Esemplare adulto di *Podarcis sicula*

Il rettile terrestre *Podarcis sicula*, il cui nome comune è lucertola campestre, insieme ad altre 17 specie, appartiene al genere *Podarcis*, che è il più complesso e numeroso di tutta la famiglia dei Lacertidae e il gruppo più diffuso nel Mediterraneo. In Europa i Lacertidae rappresentano la famiglia dominante costituendo insieme ad altre 15 famiglie il sottordine *Sauria* che, insieme con quelli di *Amphisbaenia* e *Ophidia*, forma l'ordine Squamata le cui forme più antiche risalgono alla fine del Permiano (Colosi and Baccetti 1967). Gli Squamati rappresentano un gruppo di Rettili con una struttura cranica diapside (Greco *di*, due, *apsis*, arco) modificata, perché l'arcata inferiore è interrotta nei

Lacertiliani, mentre negli Ophidia sono addirittura scomparse le due arcate, e la regione temporale rimane del tutto scoperta. La distribuzione territoriale di *Podarcis* si estende su un ampio areale che comprende gran parte dell'Europa centro-meridionale, includendo l'Italia con le sue isole maggiori, le zone costiere della Slovenia e della Croazia e parte del Montenegro. In Italia la distribuzione della specie in molte isole ed arcipelaghi dalle condizioni ambientali estremamente biodiverse (dalle isole del litorale adriatico e tirrenico a quelle sicule e sarde), ne conferma la fama di specie pioneristica e dalla facile naturalizzazione. Tali caratteristiche rendono *P. sicula* una specie diffusa e comune in tutta la Penisola inquadrandola nella categoria delle specie sub-endemiche italiane. Il facile adattamento a molteplici condizioni ambientali e il grande areale di distribuzione in Italia, hanno portato questa specie alla colonizzazione di disparate nicchie ecologiche favorendo il conseguente processo di diversificazione morfologica. Elementi distintivi specie-specifici, come parametri biometrici e cromatici, assumono in questa specie delle connotazioni aspecifiche e strettamente dipendenti dalla tipica variabilità fenotipica che *P. sicula* mostra nelle varie tipologie di habitat in cui vive.

In linea generale, le dimensioni medie dei maschi raggiungono circa 26 cm di lunghezza, con una corporatura robusta ed una testa piramidocefala. La pigmentazione dorsoventrale segue delle connotazioni caratteristiche che in alcuni casi diventano anch'esse del tutto esclusive e tipiche rappresentazioni degli endemismi sviluppati. Solitamente la parete ventrale ha una colorazione chiara normalmente biancastra, presentando, in alcuni casi ed esclusivamente nella regione delle squame ventrali esterne, delle macchie azzurre o nere, mentre una maculatura azzurra è specificamente riscontrabile nella zona ascellare. Il dorso assume la caratteristica colorazione verdastra, con tonalità varie dal verde oliva al giallo senape fino ad arrivare al marrone scuro (Corti 1999). L'ampiezza e la disposizione delle macchie dorsali in diverse specie tende a costituire una sorta di disegno striato o reticolato che, in base alla variabilità geografica di alcune popolazioni, può anche essere del tutto assente. Nelle popolazioni dell'Italia meridionale sono presenti sia fenotipi reticolati, con striature vertebrali nere e strie dorsolaterali ridotte, sia individui *concolor*, ossia di colore uniforme (Corti 1999). *Podarcis sicula* è una specie che, sfruttando la sua grande adattabilità ed il suo comportamento opportunistico, ha incrementato notevolmente le sue possibilità di sopravvivenza e dispersione in una ampia gamma di ecosistemi diversi. La definizione di animale "ubiquista" e dall'elevata valenza ecologica è derivata proprio da queste sue caratteristiche eco-etologiche che vanno dalle aree ad elevato impatto antropico a quelle

naturali. Il suo *habitat* prediletto è quello delle radure e delle aree aperte, preferendo zone in cui sia possibile trovare rifugi e facili vie di fuga come cespugli, terreni pietrosi e muri a secco (Corti 1999). Lo spettro alimentare, rispecchiando la sua attività predatoria generalista ed opportunistica, è abbastanza ampio, comprendendo principalmente Insetti e, in misura minore, Crostacei Isopodi, Gasteropodi, Araneidi e vegetali (Corti 1999). Gli individui di sesso maschile sono dotati di due organi copulatori, gli emipeni, che in condizione di riposo vengono alloggiati in apposite tasche; questi costituiscono una complessa struttura fornita di corrugamenti, punte e uncini che probabilmente consentono una più salda presa dell'organo alle pareti della cloaca femminile. La fecondazione è interna e il maschio introduce lo sperma nella cloaca della femmina mediante uno dei due organi copulatori. In *P. sicula* come negli altri Rettili, non esiste una coppia di eterocromosomi (XY) associati alla determinazione del sesso, ma i pochi geni del determinismo sessuale si trovano all'apice di una coppia di cromosomi autosomici. Il ciclo riproduttivo della specie, annuale, è fortemente influenzato dalla sua adattabilità ad ambienti così disparati ed è variabile a seconda dei biotopi presenti. La riproduzione avviene appena comincia la nuova attività annuale, che ha inizio, nelle regioni temperate, nel mese di Marzo e termina intorno a Novembre, mentre nelle zone montane la latenza invernale inizia ad Ottobre e termina ad Aprile. Il periodo di latenza invernale diminuisce progressivamente verso il limite meridionale del suo areale, annullandosi del tutto in alcuni casi particolari, come quelli relativi a popolazioni insulari e costiere. Le femmine che vivono nelle zone costiere possono riprodursi due o eccezionalmente tre volte in un anno. Le uova, in numero variabile da due ad otto, sono deposte in buche scavate direttamente dalle femmine in tronchi cavi, muretti a secco o nel terreno ed in genere i periodi preferenziali sono i mesi di Maggio e Giugno (Corti 1999). La buca generalmente funge da camera d'incubazione raggiungendo delle temperature ottimali per lo sviluppo del nascituro. La determinazione del sesso nei Lacertiliani, così come in molti Rettili, dipende dalla temperatura del terreno, in particolare le alte temperature favoriscono la nascita di maschi, mentre le basse di femmine. La dimensione delle uova è di circa 2 cm, la conformazione è di tipo ellittico e il guscio ha una consistenza pergamenacea. La schiusa avviene dopo circa due mesi e i piccoli nascono nel periodo che va da luglio, nelle zone pianeggianti e costiere, fino ad agosto nelle zone montane. Alla schiusa i giovani rompono il guscio dell'uovo con una particolare struttura epidermica corneificata transitoria della mascella superiore posta all'apice del muso (dente o caruncola dell'uovo). I neonati sono simili ai genitori e sono

del tutto autosufficienti: ciò spiega la totale mancanza di cure parentali in questi vertebrati.

○ **4.2.3 Sviluppo embrionale di *Podarcis sicula***

Gli embrioni di *Podarcis* hanno un periodo di ovulazione di alcuni giorni, a cui segue un'embriogenesi, caratterizzata, secondo (Dufaure 1966), da tre fasi differenti suddivise in 40 stadi. Le uova vengono deposte nel terreno, per cui i tempi di sviluppo variano notevolmente a seconda della temperatura dell'ambiente circostante e del suolo. Il tipo di embriogenesi è caratteristica degli animali ovipari con uova telolecitiche, come le altre specie di rettili, gli uccelli ed i mammiferi monotremi, in cui è presente una grande quantità di sostanza vitellina, che guiderà l'uovo verso una segmentazione lenta e parziale. Le diverse fasi di maturazione embrionale possono essere suddivise in tre periodi principali:

1. (Stadio 1-4 descritti da Dufaure e Hubert, corrispondenti agli embrioni nei primi giorni di sviluppo).

A questi stadi di sviluppo si ha l'inizio e la fine della segmentazione, partendo dalla formazione di un solo blastomero al centro del disco embrionale per arrivare fino alla suddivisione finale di numerosi blastomeri. I blastomeri più grandi sono in periferia e circondano i più piccoli.

2. (Stadi 5-33, corrispondenti ad embrioni dai 5 ai 20 giorni di sviluppo).

Si ha la formazione del blastoporo (stadio 5), l'individuazione del campo cefalico (stadio 8), l'abbozzo della doccia nervosa (stadio 10), la prima traccia della faringe e del cervello (stadio 15), l'identificazione di una prima diversificazione della coda (stadio 22), la differenziazione cerebrale, il primo abbozzo dell'apparato cardiaco e delle vescicole ottiche primarie (stadio 23), la comparsa delle fenditure branchiali (stadio 25), prima formazione degli arti visibili come piccole protuberanze laterali (stadio 27), la comparsa del pene (stadio 31), la differenziazione delle dita unite da membrana interdigitale (stadio 33).

3. (Stadi 34-40, corrispondenti agli embrioni dai 20 giorni di sviluppo sino alla schiusa)

Si ha la distinzione completa delle 5 dita ancora palmate (stadio 34), la mascella inferiore è completamente formata e c'è un inizio di pigmentazione sulle dita e sulla

testa (stadio 35), spuntano gli artigli ed inizia la comparsa delle squame (stadio 36), la membrana interdigitale scompare progressivamente dalle dita esterne verso quelle interne (stadio 37). L'embrione immediatamente prima della schiusa (stadio 40) ha una lunghezza totale di circa 50 mm.

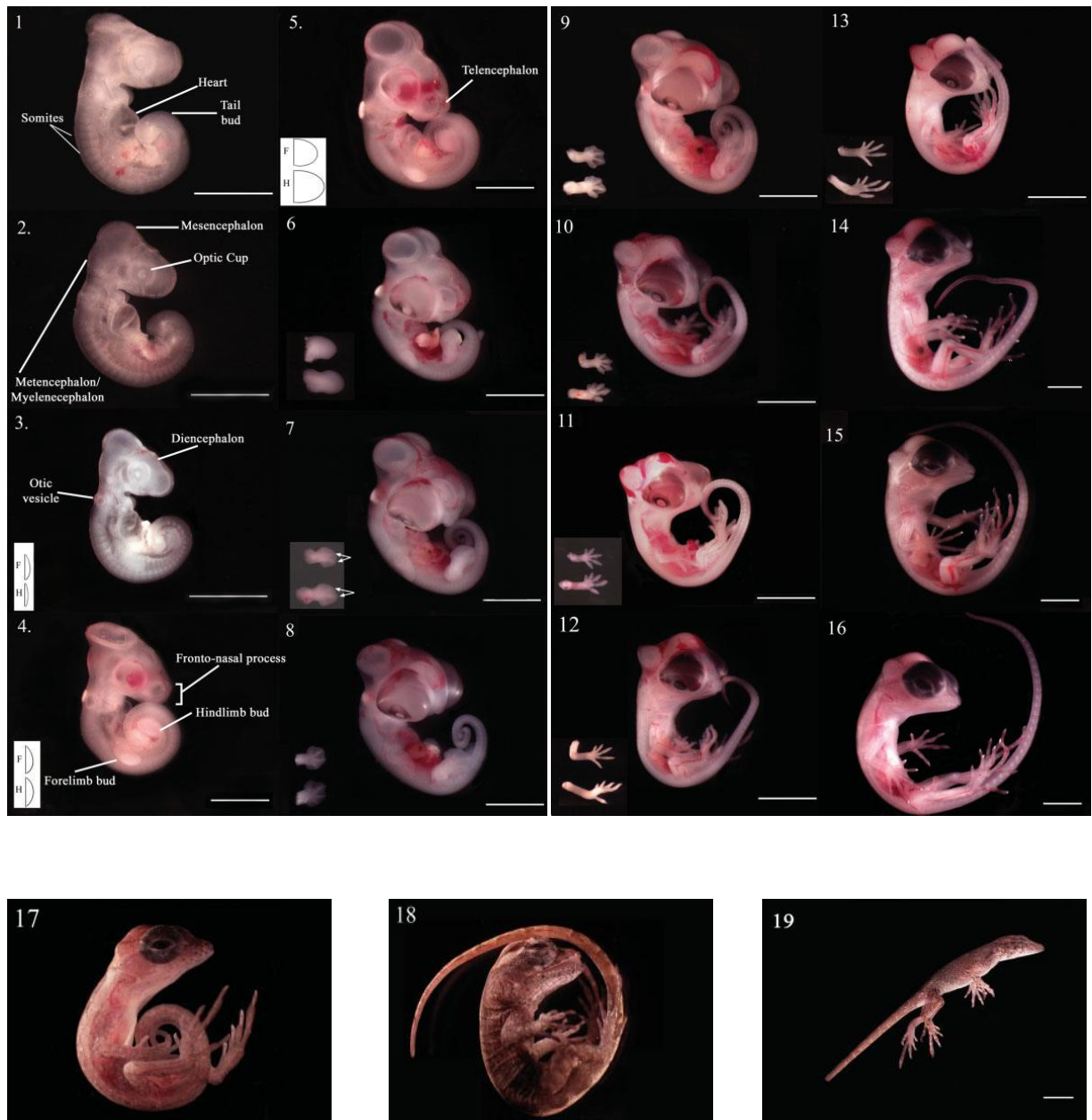


Figura 4.6: Stadi di sviluppo del lacertide *Anolis sagrei* (Sanger, Losos et al. 2008)

Capitolo 5

Materiali & Metodi



Trattamento di *Danio rerio*

- Incubazione con CdCl_2
- Incubazione a freddo



Trattamento di *Podarcis sicula*

- Incubazione con CdCl_2
- Incubazione a freddo



Analisi Morfologica

- Preparazione dei campioni per microscopia ottica
- Colorazione con emallume-eosina
- Ibridazione *in situ*
- Acquisizione delle immagini ed elaborazione delle tavole



Analisi Biomolecolare

- Preparazione ed estrazione dell' RNA totale
- Trattamento con DNAsil dell'RNA totale
- Elettroforesi su gel di agarosio
- Analisi di mRNA *Differential Display* (DDRT – PCR)
- Clonaggio dei frammenti di cDNA
- Sequenziamento dei frammenti di cDNA
- Analisi delle sequenze nucleotidiche

5.1 Trattamento di *Danio rerio*

Gli embrioni utilizzati in questo lavoro di tesi derivano da accoppiamenti di esemplari adulti di *Danio rerio*, mantenuti in acquario in condizioni stabili alla temperatura di 28 °C, e nutriti due volte al giorno con apposito mangime.

○ 5.1.1 Incubazione con CdCl₂

Gli embrioni, ottenuti da diversi accoppiamenti, sono stati prelevati dal fondo delle vasche, dopo la rimozione delle biglie, riuniti e trasferiti in *embryo solution* (Hank stock) [una soluzione di mantenimento idonea per lo sviluppo degli embrioni] per 4 ore a 28 °C. Dopo questo periodo di crescita, in condizioni fisiologiche, sono stati suddivisi in due differenti popolazioni: una (embrioni trattati) è stata trasferita in un beker contenente la soluzione di mantenimento contaminata con cadmio [100 microM] e tenuta in tali condizioni per ulteriori 4 ore; mentre l'altra popolazione (embrioni controllo), in maniera speculare, ha proseguito lo sviluppo nella soluzione di controllo senza l'immissione di alcun agente contaminante. Entrambe le soluzioni sono state mantenute ad una temperatura di 28°. Alla fine del trattamento, quindi a 8 ore dalla fecondazione (hpf), tutti gli embrioni sono stati prelevati e osservati allo stereomicroscopio per stabilire la percentuale di sopravvivenza e per eliminare, quindi, gli embrioni eventualmente morti, infine conservati a - 80°C. E' stata scelta una dose sub-letale di CdCl₂ in quanto, non provocando embriole탈ità, consente di studiare gli effetti del metallo durante lo sviluppo embrionale.

○ 5.1.2 Incubazione a freddo

In seguito ad ogni deposizione le uova fecondate sono state trasferite in normali *embryo solution*, non sottoposte ad alcun trattamento, e fatte sviluppare per 4 ore a 28°C. Trascorso tale tempo una parte degli embrioni è stata trasferita in camera fredda a 10°C per 4 ore (embrioni trattati), mentre la parte restante degli embrioni, in maniera speculare, ha proseguito lo sviluppo a 28°C (embrioni controllo). Tutti gli embrioni sono stati prelevati a 8 ore dalla fecondazione, osservati allo stereomicroscopio per stabilire la percentuale di sopravvivenza e per eliminare, quindi, gli embrioni eventualmente morti, e conservati a -80°C.

5.2 Trattamento di *Podarcis sicula*

Gli embrioni utilizzati in questo lavoro di tesi derivano da accoppiamenti di esemplari adulti di *Podarcis sicula* mantenuti in stabulario in condizioni di fotoperiodo e temperatura, e nutriti con larve vive di mosche carnarie ed acqua.

○ 5.2.1 Incubazione con CdCl₂

Le uova deposte sono state trasferite in terrari normali, non trattati, e fatte sviluppare, in condizioni fisiologiche, per 5 o 15 giorni. Trascorso tale periodo una parte degli embrioni (embrioni trattati) è stata trasferita per 5 giorni in un terrario contenente del terreno contaminato con cadmio [50 mg/Kg_{terreno}], che ha consentito di studiare gli effetti del metallo durante lo sviluppo embrionale, mentre la parte restante degli embrioni, in maniera speculare, ha proseguito lo sviluppo nel terrario di controllo che ha permesso la naturale embriogenesi (embrioni controllo). I terrari sono stati mantenuti ad una temperatura di 24°C e costantemente inumiditi mediante vaporizzazioni d'acqua.

Gli embrioni, sia controllo che trattato, sono stati prelevati a:

- 10 giorni dalla deposizione nel caso di trattamenti **5+5**
- 20 giorni dalla deposizione nel caso di trattamenti **15+5**

○ 5.2.2 Incubazione a freddo

Gli embrioni sono stati suddivisi in due terrari mantenuti alla temperatura di 24°C per 5, 15 o 20 giorni. Trascorso tale periodo, una parte degli embrioni (embrioni trattato) è stata trasferita in camera fredda a (10°C) per 5 giorni, mentre la parte restante (embrioni controllo), in maniera speculare, ha proseguito lo sviluppo nel terrario di controllo alla temperatura di 24°C. Gli embrioni, sia controllo che trattato, sono stati prelevati a :

- 10 giorni dalla deposizione nel caso di trattamenti **5+5**
- 20 giorni dalla deposizione nel caso di trattamenti **15+5**
- 25 giorni dalla deposizione nel caso di trattamenti **20+5**

** con la numerazione doppia, utilizzata per i trattamenti sopra riportati (es. 5+5), si indicano 2 momenti: il primo numero si riferisce allo stadio di sviluppo dell'embrione in cui è iniziato il trattamento, il secondo, alla durata del trattamento.*

5.3 Analisi Morfologica

○ 5.3.1 Preparazione dei campioni per la Microscopia Ottica

Gli embrioni prelevati sono stati fissati in *Bouin* (15 ml di acido picrico, 5 ml di formalina, 1 ml di acido acetico) per 6 ore. I pezzi ottenuti sono stati lavati a lungo in alcool etilico 75°, e poi sono stati disidratati ponendoli prima in alcool 95° (24 ore), e poi in alcool 100° (3 ore) e infine chiarificati in xilolo (almeno 48 ore), a cui fa seguito l'inclusione dei pezzi in paraffina. Gli embrioni "inclusi" sono stati sezionati al microtomo e le sezioni seriate così ottenute, dello spessore di 6 micron, sono state montate su vetrini utilizzando acqua distillata e piastra riscaldata ad una temperatura massima di 40°C.

○ 5.3.2 Colorazione Emallume-eosina

Le sezioni sono state sparaffinate in xilolo, reidratate in una serie decrescente di alcool etilico e colorate con emallume-eosina.

- L'emallume è un colorante nucleare e colora il nucleo in varie tonalità di blu. La sua azione è ottimale se si trova in ambiente acido nel quale, avendo carica positiva, reagisce con i gruppi fosforici (carichi negativamente) del DNA. La differenziazione va fatta in acqua corrente e fa virare, per un pH superiore a 3, il colore fissato nei nuclei da violetto ad azzurro-blu.
- L'eosina è un colorante artificiale acido e si può avere in varie forme; la più comune è l'eosina gialla. Questo composto è solubile in alcool e acqua (soluzione all'1%); è specifica per il citoplasma e le sostanze intercellulari che vengono colorate in rosa, più o meno intensamente. La differenziazione viene fatta in alcool a 95°.

Il risultato della colorazione combinata con emallume-eosina è una colorazione azzurro scuro per i nuclei e una colorazione rosa per il citoplasma.

Qui di seguito sono riportate le fasi della colorazione:

- Emallume per 10 min.
- Differenziamento in acqua corrente fino al viraggio verso l'azzurro, circa 10 min.
- Eosina per 1 min.
- Differenziamento in alcool (passaggio rapido, pochi secondi).

Una volta colorate le fette poste sui vetrini, sono state nuovamente disidratate mediante passaggio in serie crescente di alcool etilico e poi si è proceduto al montaggio del vetrino con histovitrex (Carlo Erba).

○ 5.3.3 Ibridazioni *in situ*

Per l'ibridazione le sezioni sono state sparaffinate e idratate nella serie discendente degli alcool, fissate in paraformaldeide 4%, in PBS per 30 minuti ad una temperatura di 4°C, ed immerse nella soluzione proteinasi-K (proteasi-K 10 µg/ml in Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7.2) ad una temperatura di 37°C per 15 minuti. Ad ogni step le sezioni sono state lavate in PBS (3 passaggi della durata di 5 minuti ciascuno).

Per l'ibridazione, condotta usando una sonda a cDNA, le sezioni sono state preibridate a 37°C per un tempo di 60 minuti utilizzando una miscela di formammide 40%, SSC 5x, Denhardt's 1x (Ficoll 0.02%, PVP 0.02% BSA 10 mg/ml), tRNA+DNA carrier, e incubate con la mix di ibridazione (cDNA 1 mg/ml in mix di preibridazione), precedentemente riscaldata a 100°C, in camera umida a 43°C overnight. Dopo ibridazione le sezioni sono state lavate con SSC 20x (NaCl 3M, citrato di Na 0.3M, pH 7.0) a salinità decrescente. Successivamente le sezioni sono state lavate in buffer A (Tris-HCl 1M pH 7.5, NaCl 2.5 M) per 5', incubate in buffer B (Bloacking reagent 0,5%) per 30' minuti ed incubate al buio per 2 ore con anticorpo anti digossigenina-AP (Boehringer Mannheim) ad una concentrazione di 1:100 in buffer B. I preparati sono stati poi lavati in buffer A (2 passaggi da 15'), incubati in buffer C (Tween20 10%, levamisole 50 mg/ml) per 15' e colorati con una miscela di colorazione (1 ml BM-purple + 10 µl buffer C). La colorazione è stata seguita al microscopio e bloccata in TE 1x per di 15'. I vetrini sono stati montati con la soluzione di montaggio (glicerolo 50% in TE 1x).

Marcatura della sonda a cDna

La marcatura è stata ottenuta mediante PCR contenente il frammento nucleotidico (0.5 µg) di nostro interesse, precedentemente amplificato e purificato, 5U di Taq DNA polimerasi (Perkin Elmer), 0.2 mM (concentrazione finale) di dNTP in Tris/HCl marcati con digossigenina (Roche) 10 mM pH8.3, KCl 5 mM, MgCl₂ 2.5 mM, e 50 pmoli di ciascuno dei primers specifici disegnati sul frammento da amplificare disponibili in laboratorio.

○ 5.3.4 Acquisizione delle immagini ed elaborazione delle tavole

Le immagini di microscopia ottica sono state acquisite utilizzando una telecamera Progress 3800 (Kontron Elettronica) montata su un microscopio Zeiss Axioskop ed il programma Ks300. Le foto sono state assemblate in tavole, utilizzando programmi specifici di grafica per PC.

5.4 Analisi Biomolecolare

○ 5.4.1 Preparazione ed estrazione dell' RNA totale

L'RNA totale è stato estratto da un pool di embrioni controllo e da un pool di embrioni trattati (con cadmio o stress da freddo) utilizzando il reagente TRI-RIAGENT (Sigma Chemical), secondo il metodo messo a punto da Chomczynski e Sacchi (2006). Gli embrioni sono stati omogeneizzati in *dounce* di vetro con 1ml di reagente ogni 100 mg di tessuto. I campioni sono stati agitati, lasciati a temperatura ambiente per 10 min e centrifugati a 17.000g per 15 minuti. Dopo la centrifugazione, è stata prelevata la fase acquosa contenente l'RNA, che è stato recuperato mediante precipitazione con isopropanolo. L'RNA risultante è stato lavato con etanolo, centrifugato a 6.700g per 5 minuti e i pellet sono stati ripresi in H₂O trattata con l'inibitore delle ribonucleasi DEPC (dietilpirocarbonato) allo 0,1%.

○ 5.4.2 Trattamento con DNAsiI dell'RNA totale

Allo scopo di eliminare qualsiasi contaminazione di DNA genomico dall'RNA totale estratto, i campioni sono stati trattati con DNAsi I utilizzando il kit Turbo DNA – *free* (Applied biosystem), seguendo le istruzioni riportate.

○ 5.4.3 Elettroforesi su gel di agarosio

La purezza e la concentrazione dell'RNA estratto sono state verificate mediante spettrofotometria (260 nm, 280nm, 260/280) ed elettroforesi. L'analisi elettroforetica è stata effettuata su gel di agarosio all'1,2% in tampone TAE (Tris – Acetato – EDTA), con un apparecchio per l'elettroforesi orizzontale. La corsa elettroforetica è durata 30 min a 50 Volt costanti. Nella composizione del gel è stato aggiunto bromuro d'etidio, un agente intercalante, ad una concentrazione finale di 1 µg/ml, che permette di visualizzare l'RNA e/o il DNA mediante irraggiamento del gel con luce ultravioletta.

○ 5.4.4 Analisi di mRNA *Differential Display* (DDRT – PCR)

Le analisi di *Differential Display* sono state condotte utilizzando l'*RNA Image kit* (GenHunter), seguendo il relativo protocollo. La tecnica del DD prevede una serie di passaggi graduali che, partendo dall'estrazione dell'RNA totale da due sottopopolazioni (in questo caso rappresentati dagli embrioni trattati e controllo), permette di identificare l'accensione o lo spegnimento di tutti quei geni che sono stati influenzati dal trattamento, ovvero permette di valutare l'espressione genica differenziale tra due popolazioni a confronto. Il DD viene spesso più correttamente indicato come DDRT – PCR perché si avvale della retrotrascrizione inversa (RT) per generare delle subpopolazioni di DNA copia (cDNA) a singolo filamento, le quali sono impiegate successivamente come stampo in una serie di reazioni di polimerizzazioni a catena (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) con aggiunta di primer *forward* (direzione 5'-3') random e oligo dT *reverse* (direzione 3'-5') complementari alla coda di poli-A tipica degli mRNA. Le subpopolazioni di cDNA a doppio filamento ottenute dalle varie reazioni di PCR, sono separate per dimensione tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio, il quale rileva, tramite colorazione con bromuro d'etidio e successiva esposizione ai raggi UV, una chiara visualizzazione delle bande di cDNA espresse o represses dal trattamento. Le bande d'interesse, una volta eluite da gel, sono riamplicate con la stessa coppia di primer che le ha generate, clonate in vettori opportuni e sequenziate. L'interrogazione, mediante specifici software, di banche dati genomiche e/o proteomiche per la ricerca di eventuali similarità e/o identità con geni e proteine note, permette d'identificare i geni e le proteine coinvolti nell'espressione genica differenziale e, quindi, anche nella risposta molecolare allo specifico trattamento.

La DDRT-PCR, appena descritta, ed utilizzata nel corso degli esperimenti, è una variante della tecnica canonica messa a punto da Liang e Pardee nel 1992 (Liang and Pardee 1992), che invece prevede:

- Utilizzo del radioattivo per marcare i deossinucleotidi utilizzati nel corso della reazione a catena della polimerasi, e in questo studio sostituiti dal bromuro d'etidio
- Utilizzo di un gel di Poliacrilammide/urea per la separazione elettroforetica delle bande di cDNA, e questo studio sostituito dal gel di agarosio
- Utilizzo dell'autoradiografia per la rivelazione delle bande, e questo studio sostituita dai raggi ultravioletti

L'uso di materiale radioattivo non solo comporta elevati costi di gestione, ma è tossico e pericoloso, sia per l'operatore che per l'ambiente. Occorre, infatti, prestare molta attenzione nel lavorare con i radioattivi, evitare contaminazioni nell'ambiente e provvedere ad un corretto smaltimento. Per ovviare al problema, in questo lavoro di tesi è stata applicata la metodica alternativa di *Differential Display* appena descritta, che non prevede l'impiego di isotopi radioattivi e, di conseguenza nemmeno l'autoradiografia su gel di poliacrilammide (altra sostanza altamente tossica) come metodo di rilevazione per i prodotti di PCR differenzialmente espressi in due popolazioni a confronto.

La descrizione dettagliata di ogni singolo step operativo è riportata di seguito.

1. Produzione del cDNA a singola elica

Il cDNA a singola elica è stato prodotto a partire da:

- 5 µg di RNA totale (estratto da un pool di embrioni controllo e trattati)
- 1 µl di dNTP mix [10 mM ciascuno] (miscela contenente i deossiribonucleotidi dATP, dGTP, dTTP e dCTP);
- come primer di innesco della reazione, 1 µl di uno dei tre oligo (dT) con una base ancorata (h-T₁₁M, dove M = A, G, C) forniti dall'RNA Image Kit (GenHunter); in tal modo, sono stati prodotti 3 diversi cDNA per ognuno dei tre primers utilizzati, ottenendo così un cDNA-A, un cDNA-G e un cDNA-C, rispettivamente per gli RNA controllo e trattati di partenza.
- acqua sterile per un volume finale di 12 µl.

La miscela preparata è stata riscaldata per 5 min a 65°C ed è stata immediatamente raffreddata ponendola per qualche istante su ghiaccio.

Sono stati poi aggiunti:

- 4 µl di 5x first-strand buffer
- 2 µl di ditiotreitolo (DTT) [0.1 M];
- 1 µl di inibitore delle RNAsi (*RNAsi-Out recombinant ribonuclease inhibitor*) [40u/ µl].

La miscela ottenuta è stata riscaldata per 2 min a 42°C e poi è stato aggiunto 1 µl dell'enzima SuperScript II Reverse Transcriptase. La reazione enzimatica di trascrizione inversa è stata condotta a 42°C per 50 min. Successivamente, l'enzima è stato inattivato incubando la miscela a 70° C per 15 minuti.

2. Amplificazione mediante Differential Display PCR

Le reazioni di PCR sono state condotte utilizzando come DNA stampo ciascun cDNA a singola elica ottenuto dalla reazione di trascrizione inversa, in un volume finale di 20 µl. In ogni reazione è stato utilizzato un differente 5' – primer arbitrario (primer H-AP) e il corrispondente 3' - oligo (dT) (primer H-TA/C/G).

La miscela di reazione della PCR conteneva in un volume di 20 µl:

- 2 µl di cDNA a singola elica;
- 2 µl di buffer PCR 10x che serve a mantenere il pH stabile, necessario per costituire l'ambiente adatto alla reazione;
- 1,6 µl di mix dei dNTP [25 mM];
- 2 µl di primer *forward* H-AP [2 µM];
- 2 µl di primer *reverse* oligo dT [2 µM];
- 0,2 µl di enzima TaqDNA polimerasi (5U/µl);
- 10,2 µl di acqua per un volume finale di 20 µl.

Le miscele di reazione sono state sottoposte a cicli di PCR secondo il seguente programma:

- la soluzione di DNA da replicare è portata ad una temperatura di 94° C per 30 sec. Ci si trova, di conseguenza, in una situazione in cui gli eventuali dimeri di DNA vengono denaturati ed i filamenti di cDNA a singola elica sono completamente liberi (fase di *denaturazione*);
- successivamente la temperatura viene portata a 40°C per 2 min al fine di permettere il legame dei *primer* alle regioni loro complementari dei filamenti di DNA denaturati (fase di *annealing*);
- infine la temperatura viene alzata a 72°C per 30 sec al fine di massimizzare l'azione della *Taq polimerasi* - enzima termofilo e termostabile la cui attività è massima alle alte temperature - che determina la polimerizzazione del DNA a partire dai *primer* legati, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA (fase di *prolungamento* o *polimerizzazione*).

Il ciclo descritto è stato ripetuto 40 volte, seguito da uno step di elongazione finale a 72° per 5 min. In genere non si superano i 50 cicli in quanto ad un certo punto la quota di DNA ottenuto raggiunge un *plateau*. Ciò avviene, ad esempio, per carenza degli oligonucleotidi usati come inneschi o per diminuzione dei dNTP. I cicli di PCR sono stati eseguiti in un termociclatore BIO-RAD.

3. Elettroforesi su gel di agarosio

Le reazioni di PCR sono state sottoposte ad elettroforesi su gel di agarosio (20x25 cm) al 2% in tampone TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x. Nella composizione del gel è stato aggiunto bromuro di etidio ad una concentrazione finale di 1 µg/ml. I campioni da caricare sul gel avevano un volume finale di 5 µl e contenevano:

- 2 µl di prodotto della reazione di PCR;
- 1 µl di *loading buffer* 5x (0,25% blu di bromofenolo, 30% glicerolo in acqua);
- 2 µl di acqua.

Al fine di stabilire la lunghezza delle varie specie molecolari presenti nel nostro campione, è stato caricato sul gel un marcatore di dimensioni (detto genericamente *marker* o *standard*) accanto ai campioni. Nel caso del DNA, si tratta di una serie di frammenti di DNA di lunghezza nota e definita, così al termine dell'elettroforesi, il confronto tra la mobilità del campione in esame rispetto al marcatore permetterà di determinare con buona approssimazione la dimensione dei frammenti di DNA presenti nel campione. Pertanto, è stata preparata una soluzione standard con volume finale di 5 µl che conteneva:

- 0,5 µl di marcatore (*100 bp DNA ladder*, Invitrogen)
- 1 µl di *loading buffer* 5x
- 3,5 µl di acqua

I campioni sono stati sottoposti a corsa elettroforetica, al termine della quale le bande sono state visualizzate al transilluminatore.

4. Escissione, purificazione e riamplicazione delle bande differenzialmente espresse

Le bande di cDNA differenzialmente espresse sono state recuperate tagliando il corrispondente pezzo di gel e sono state sottoposte ad estrazione e purificazione, utilizzando il *PCR Clean up extraction kit* (Eppendorf), secondo protocollo.

Infine, le bande sono state riamplicate, sempre mediante PCR, utilizzando le stesse coppie di primer che le hanno generate nelle reazioni di Differential Display PCR e condotte alle condizioni precedentemente descritte.

La conferma dell'avvenuta riamplicazione delle bande è stata ottenuta mediante corsa elettroforetica dei prodotti di PCR su un mini gel (5x7 cm) di agarosio al 2%.

○ 5.4.5 Clonaggio dei frammenti di cDNA

1. Produzione del plasmide ricombinante

Ciascun frammento di cDNA differenzialmente espresso, proveniente dalle reazioni di PCR, è stato inserito in un vettore plasmidico pCRII-TOPO, già linearizzato, contenuto nel *TOPO TA Cloning kit* (Invitrogen).

Tale vettore contiene il gene per un enzima con attività β -lattamasica, la quale conferisce al batterio ospite la resistenza all'antibiotico ampicillina; inoltre lega covalentemente l'enzima *Topoisomerasi I* e presenta la caratteristica di avere all'estremità 3' una T- protrudente, complementare alla A- protrudente presente al 3' del DNA amplificato per PCR, che favorisce l'inserzione del frammento. La miscela di reazione contiene:

- 3 μ l di Buffer fornito dal kit
- 2 μ l di prodotto di PCR
- 1 μ l di vettore

Il legame tra il frammento di cDNA e il plasmide avviene senza l'aggiunta di ulteriori enzimi, mediante incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti.

2. Trasformazione di cellule batteriche con il plasmide ricombinante

Le cellule trasformate dall'ingresso del DNA plasmidico crescono su terreno contenente ampicillina, mentre le cellule senza plasmide, non essendo resistenti all'ampicillina, soccombono. A 50 μ l di cellule competenti sono stati aggiunti 4 μ l della miscela proveniente dalla reazione con l'enzima *Topoisomerasi I* ed i campioni sono stati incubati su ghiaccio per 30 min. E' stato poi effettuato lo shock termico mediante incubazione a 42°C per 30 secondi. Al termine di questa reazione ai campioni sono stati aggiunti 250 μ l del mezzo di crescita batterica SOC – medium ed è stata effettuata la crescita delle cellule a 37°C per un'ora. Trascorso tale lasso di tempo, 100 μ l della coltura sono stati piastrati su di un terreno solido (LB – Agar + ampicillina 50 μ g/ml) e le piastre sono state incubate a 37°C per 16 ore, per permettere la crescita dei batteri ricombinanti e la formazione di colonie.

3. Purificazione del DNA plasmidico ricombinante

Il DNA plasmidico è stato purificato utilizzando il *Fast Plasmid kit* (Eppendorf) basato sul metodo della lisi con alcali descritto da Sambrook e coll. (2001). Una singola colonia

batterica opportunamente trasformata con il plasmide contenente il frammento di DNA esogeno è stata inoculata in 5 ml di LB contenente Ampicillina 50 µg/ml e fatta crescere a 37°C per 16 ore. La coltura è stata poi centrifugata a 8.000 g per 5 min ed il pellet batterico risospeso in tampone Tris – HCl 50 mM pH 8.0 contenente EDTA 10 mM. Successivamente la sospensione batterica è stata lisata in condizioni alcaline ed il lisato neutralizzato in un tampone ad elevata concentrazione salina. Il DNA plasmidico è stato quindi adsorbito su una colonnina di gel di silice e separato da RNA, proteine ed altri elementi cellulari. L'eluizione finale è avvenuta in Tris 10 mM pH 8.0. Il DNA plasmidico purificato è stato controllato mediante elettroforesi su gel di agarosio. Accanto al campione, sono stati caricati anche il vettore richiuso su se stesso, senza alcun inserto, ed uno standard contenente un vettore chiuso a concentrazione nota.

○ 5.4.6 Sequenziamento dei frammenti di cDNA

Il DNA plasmidico purificato è stato sottoposto a sequenziamento automatico dalla ditta PRIMM Biotech, usando, come innesco della reazione di sequenziamento, i primer T7 e T3, complementari a specifiche sequenze presenti sul plasmide, ai lati del sito di clonaggio.

○ 5.4.7 Analisi delle sequenze nucleotidiche

Le analisi delle sequenze nucleotidiche ottenute sono state effettuate usando i programmi *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) e *Fast-All* (FASTA) disponibili on-line presso il sito web www.ebi.ac.uk dell'*European Bioinformatic Institute* (EBI).

Entrambi i software di bioinformatica utilizzati, partendo da algoritmi diversi, permettono di confrontare sequenze aminoacidiche o nucleotidiche sconosciute con quelle contenute nelle banche dati nucleotidiche e aminoacidiche EMBL.

Capitolo 6

Risultati I^a Parte

Analisi degli effetti dello stress sugli embrioni



Danio rerio

- Effetti dello stress a livello morfologico
- Effetti dello stress a livello molecolare



Podarcis sicula

- Effetti dello stress a livello morfologico
- Effetti dello stress a livello molecolare

6.1 *Danio rerio*

○ 6.1.1 Effetti dello stress a livello morfologico

Dati recenti mostrano che concentrazioni subletali (100microM) di cadmio inficiano una corretta neurogenesi e retinogenesi negli embrioni esposti. In particolare, studi condotti su embrioni di *Danio rerio* hanno dimostrato che l'esposizione a questo metallo pesante durante una fase medio-avanzata dell'embriogenesi (durante la somitogenesi, 24 hpf) provoca alterazioni che si palesano a livello fenotipico come ipoplasie del capo e degli occhi (Chow, Hui et al. 2008). Valutando le capacità visive degli embrioni con difetti oculari si è visto che embrioni esposti al cadmio mostrano alterazioni comportamentali, iperpigmentazione, cecità o perdita di risposta alla luce. Tali alterazioni morfologiche sono il risultato dell'azione del cadmio a livello molecolare durante l'embriogenesi, soprattutto durante lo sviluppo della retina (Chow, Hui et al. 2008). Di contro, in letteratura ci sono poche informazioni sugli effetti degli agenti stressori negli stadi più precoci di sviluppo embrionale; poiché durante queste fasi sono ancora in atto i movimenti morfogenetici che collocheranno i territori presuntivi embrionali nella posizione definitiva, fin tanto che tali processi non si concludono, risulta complicato riscontrare evidenti anomalie dello sviluppo unicamente sul piano morfologico. Durante questo lavoro di tesi sono stati utilizzati embrioni di *Danio rerio* in fasi precoci dello sviluppo, in particolare durante le fasi di segmentazione e gastrulazione (da 4 a 8 hpf), quindi anche in questo caso è risultato difficile effettuare una discriminazione "macroscopica" tra gli embrioni tenuti in condizioni fisiologiche e quelli invece sottoposti a trattamento. Infatti per entrambi gli stimoli stressori - cadmio e freddo - l'unica informazione proveniente dai trattamenti effettuati, basata sulla semplice osservazione degli embrioni, riguarda soprattutto eventi di *embriomortalità-stress-indotta* piuttosto che di *embriotossicità*. Soltanto per quanto riguarda lo studio dello stress da basse temperature (10°C), è stato dimostrato un prevedibile rallentamento dello sviluppo degli embrioni tenuti a freddo, rispetto ai controllo.

○ 6.1.2 Effetti dello stress a livello molecolare

Gli esperimenti condotti nel corso di questo lavoro di tesi confermano una chiara alterazione dell'espressione genica negli embrioni sottoposti a stress sia di natura chimica, con cadmio, che di natura fisica, shock termico da basse temperature,

evidenziando principalmente che le alterazioni coinvolgono lo sviluppo del sistema nervoso, l'integrità delle membrane cellulari e i meccanismi di regolazione genica.

Effetto del Cadmio sull'espressione genica in embrioni di *Danio rerio*

Allo scopo di valutare i possibili effetti del cadmio sull'espressione genica, è stata usata la tecnica dell'mRNA *Differential Display* (DDRT – PCR), particolarmente utilizzata in tutti gli studi su fenomeni biologici che implicano cambiamenti nell'espressione genica. Questa tecnica ha previsto inizialmente l'estrazione dell'RNA totale da due diverse popolazioni di embrioni, trattati e controllo. In figura 6.1 sono mostrate le due popolazioni di RNA ottenute dopo purificazione con DNAsi I.

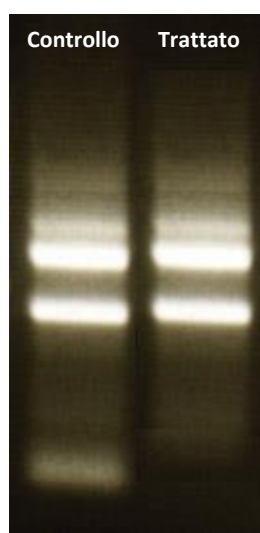


Figura 6.1: Elettroforesi su gel di agarosio dell'RNA totale estratto da embrioni incubati in mezzo normale (controllo) e contaminato con 100 μ M Cd (trattato).

Dalle due popolazioni di RNA sono state preparate tre subpopolazioni di cDNA a singolo filamento mediante retrotrascrizione, utilizzando tre diversi 3' – oligo (dT) (H – T₁₁A, H – T₁₁G, H – T₁₁G) come primer d'innescio della reazione.

Le tre popolazioni di cDNA così ottenute sono state sottoposte ad una serie di amplificazioni per PCR ottenute combinando diversi 5'–random primer arbitrari (HAP_n) a nostra disposizione con i 3'–oligo(dT) primer ancorati che hanno generato il cDNA di partenza, utilizzato come template della reazione.

Di seguito sono riportate le relative sequenze dei primer di cui abbiamo usufruito, per un totale di 19 combinazioni esaminate:

H-T₁₁**A**: 5'-AAGCTTTTTTTTTTTTA-3'

H-T₁₁**C**: 5'-AAGCTTTTTTTTTTTTC-3'

H-T₁₁**G**: 5'-AAGCTTTTTTTTTTTTG-3'

H-AP**1**: 5'-AAGCTTGATTGCC-3'

H-AP**2**: 5'-AAGCTTCGACTGT-3'

H-AP**3**: 5'-AAGCTTTGGTCAG-3'

H-AP**4**: 5'-AAGCTTCTCAACG-3'

H-AP**5**: 5'-AAGCTTAGTAGGC-3'

H-AP**6**: 5'-AAGCTTGCACCAT-3'

H-AP**7**: 5'-AAGCTTAACGAGG-3'

H-AP**8**: 5'-AAGCTTTTACCGC-3'

I prodotti delle reazioni di PCR sono stati separati per dimensione mediante elettroforesi su gel di agarosio e visualizzati agli ultravioletti grazie alla presenza del bromuro d'etidio. Tutte le reazioni di PCR sono state eseguite in duplicato, al fine di evitare di considerare dei falsi positivi; soltanto le bande che sono risultate differenzialmente espresse in entrambi i campioni caricati, sono state sottoposte ad ulteriori analisi. Inoltre, è stata posta l'attenzione soprattutto su quelle bande la cui alterazione risultava molto netta, fornendo, quindi, una selezione dei frammenti qualitativa oltre che quantitativa. Infine, sono state considerate ed analizzate solo bande che avevano una lunghezza superiore alle 100 paia di basi (bp), valore ritenuto indispensabile per poter escludere che si trattasse di una banda artefatta, dovuta ad un'aggregazione di *primer*, e per poter ottenere informazioni significative circa la natura del trascritto, dopo averlo isolato ed analizzato.

Il confronto tra i pattern elettroforetici delle due subpopolazioni di RNA in esame (controllo e trattato con Cd) ha mostrato un'evidente alterazione dell'espressione genica, soprattutto sotto forma di attivazioni (*up-regulation*) di alcuni trascritti dopo il trattamento con cadmio. In figura 6.2 è mostrato un esempio di *up-regolazione* di geni indotta dal trattamento con cadmio.

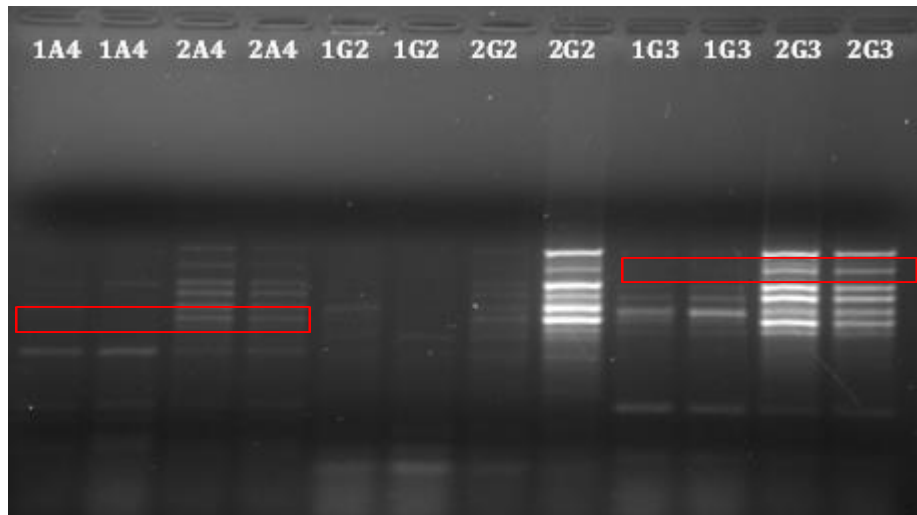


Figura 6.2: Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti ottenuti dal DDRT-PCR.
Le bande up-regolate sono evidenziate in rosso.

Nella tabella 1 sono riportati le sigle dei trascritti differenzialmente espressi. In particolare le diverse combinazioni di PCR hanno permesso l'individuazione di 3 trascritti attivati dalla presenza del cadmio.

Tabella 1: Elenco delle bande differenzialmente espresse in seguito ad esposizione a cadmio

Clone	Primers	Effetto Cd
2A4	H – T ₁₁ A/H – AP4	+
2A4	H – T ₁₁ A/H – AP4	+
2G3	H – T ₁₁ G/H – AP3	+

La nomenclatura delle bande permette di individuare le principali caratteristiche delle stesse. Il numero 1 iniziale identifica le bande provenienti dalle PCR condotte con il cDNA controllo, il numero 2 i frammenti ottenuti dalle PCR condotte con il cDNA degli embrioni contaminati con cadmio: di conseguenza tutti i frammenti selezionati che iniziano con 1 rappresentano delle bande inibite dall'azione del cadmio (presenti nel cDNA controllo e non in quello derivante da embrioni trattati), i frammenti che iniziano con 2 rappresentano delle bande indotte dal cadmio; al numero iniziale segue poi la lettera C o G o A, che identifica il tipo di 3'-oligo(dT) utilizzato nella reazione di

retrotrascrizione dell'RNA; il numero successivo identifica il 5'-primer arbitrario utilizzato in coppia con il 3'-oligo(dT) per le reazioni di PCR.

Identificazione dei cloni

I trascritti in esame sono stati eluiti dal gel di agarosio, come descritto nei metodi, e riamplicati tramite PCR, utilizzando come innesco la stessa coppia di primers che li avevano generati. I frammenti così ottenuti sono stati clonati nel vettore plasmidico pCRII-TOPO utilizzando come cellula ospite un ceppo di *E. Coli*, come descritto in precedenza. Una volta recuperati i vettori plasmidici ricombinanti dalle cellule ospite, si è proceduto al sequenziamento automatico dei 3 trascritti.

Di seguito sono riportate le sequenze ottenute, con la relativa lunghezza in coppie di basi (*base pairs*, bp).

1) Clone 2A4 – (254 bp)

AAGCTTCTCAACGCACCAGAAGGTATGAAAGATTATCTTCAGCGCTACAGTGAGGGCATGA
AGAGGGTTCTTAATACTTTTGGGCCTGTTCCAGATTTTCTGGAGAGCCCGCAGCTAGAGT
TATAAAAGAGATCTGTGAAGTATTCCTGGCGAGCAGGAGCATCTATCAGCTAGGAGAGAG
AGAAGAGATCAGCTGCTGATGGGACTAGCTAAACTCAAGGAATGAGGCTAGTCAA TAAAAA
AAAAAAGCTT

3' primer oligo (dT) H-T₁₁A: AAGCTTTTTTTTTTTTA

5' random primer H-AP4: AAGCTTCTCAACG

2) Clone 2A4 – (161bp)

AAGCTTTTTTTTTTTTACCAATGGCATAGGCCTCAGCATCAATAGTAGGAATGGCATATATT
CCACTGTTTGTCAACATGACACCTTTTCTGTTTGGATCATCAACCTCCACCATGAACTCC
GAGGTATTCCTGTGCTTTTCTTTATCCGTTGAGAAGCTT

3' primer oligo (dT) H-T₁₁G: AAGCTTTTTTTTTTTTA

5' random primer H-AP2: AAGCTTCTCAACG

3) Clone 2G3 – (318 bp)

AAGCTTTGGTCAGAGTGTGCCGTCATTACATCAGACTGAAATCTAAATTTGTTTTAATTTA
GATGCTTGTATGTTTGTGTACTCCTCGAATGTGGCCATTTGGCTTTTGGTCTGTTTGTGT
AAACTCACCTCAAATAAATATTATTATTATTGTTATTATGAAGAAATTTAGGGTAAATT
TTATTTTTTACACAGATCCAGAAAATGTATAATTTGGAATAAACAGATTCTAAAAGAGGTT
ATGTTATGTGTATATGAAATATTTGTAAATACAGAAGTAATAAACAGTATTTTGTGTCCAA
AAAAAAAAGCTT

3' primer oligo (dT) H-T₁₁G: AAGCTTTTTTTTTTTTG

5' random primer H-AP3: AAGCTTTGGTCAG

Al fine di identificare il gene corrispondente a questi trascritti, è stato eseguito un confronto tra le sequenze ottenute e quelle presenti nella banca dati nucleotidica EMBL. L'analisi delle sequenze è stata effettuata con i programmi informatici BLASTA E FASTA e i risultati ottenuti da ciascuna analisi sono stati comparati e selezionati in base ai valori di maggiore attendibilità. Sono stati considerati significativi solo i dati che riportano un valore di E (*Expect value*, o valore di score) $<1^{-4}$. Esso esprime la probabilità che l'allineamento trovato sia casuale, quindi più basso è il valore di E, maggiore è la probabilità che l'allineamento non sia casuale. Questo valore dipende, comunque, oltre che dalla similarità, anche dalla abbondanza delle sequenze presenti nel database. I risultati ottenuti dagli allineamenti sono riportati in Tabella 2.

Tabella 2: Elenco dei trascritti con elevata similarità con geni codificanti proteine note

Clone	bp	Effetto Cd	Similarità	Identità	Funzione biologica
2A4	254	+	Danio rerio crystallin, lambda 1	100%	Metabolismo acidi grassi
2A4	161	+	Danio rerio retinoblastoma binding protein 6	98%	Proliferazione cellulare
2G3	318	+	PREDICTED: Danio rerio zinc finger protein, X-linked (zfx)	100%	Regolazione trascrizionale

Effetto del freddo sull'espressione genica in embrioni di *Danio rerio*

La tecnica del mRNA *Differential Display* (DDRT – PCR) è stata utilizzata anche per valutare i possibili effetti di uno shock termico (in questo caso un brusco raffreddamento della temperatura di incubazione) sull'espressione genica. Anche in questo caso il primo step è stato l'estrazione dell'RNA totale da embrioni controllo e sottoposti a stress termico. Le due popolazioni di RNA sono state trattate con DNasi I; dopodiché si è proceduto all'osservazione dell'RNA su gel di agarosio per stabilirne l'integrità e la pulizia; la concentrazione finale è stata determinata mediante spettrofotometria a 260 nm. Così come è stato descritto in precedenza per l'analisi dei trascritti dopo trattamento con Cd, dalle due popolazioni di RNA sono state preparate

tre subpopolazioni di cDNA a singolo filamento mediante retrotrascrizione, utilizzando tre diversi 3' – oligo (dT) (H – T₁₁A, H – T₁₁G, H – T₁₁G) come primer d'innesco della reazione, e i diversi cDNA sono stati sottoposti ad amplificazione per PCR. In questo caso, combinando le sequenze dei 5'–random primer arbitrari (HAP_n) e dei 3'–oligo(dT) descritti di seguito, sono state condotte reazioni di PCR per un totale di 27 combinazioni.

H-T₁₁A: 5'-AAGCTTTTTTTTTTTTA-3'

H-T₁₁C: 5'-AAGCTTTTTTTTTTTTC-3'

H-T₁₁G: 5'-AAGCTTTTTTTTTTTTG-3'

H-AP1: 5'-AAGCTTGATTGCC-3'

H-AP2: 5'-AAGCTTCGACTGT-3'

H-AP3: 5'-AAGCTTTGGTCAG-3'

H-AP4: 5'-AAGCTTCTCAACG-3'

H-AP5: 5'-AAGCTTAGTAGGC-3'

H-AP6: 5'-AAGCTTGCACCAT-3'

H-AP7: 5'-AAGCTTAACGAGG-3'

H-AP8: 5'-AAGCTTTTACCGC-3'

H-AP9: 5'-AAGCTTCATTCCG-3'

H-AP10: 5'-AAGCTTCCACGTA-3'

H-AP11: 5'-AAGCTTCGGGTAA-3'

H-AP16: 5'-AAGCTTTAGAGCG-3'

H-AP17: 5'-AAGCTTACCAGGT-3'

I prodotti di PCR sono stati separati per elettroforesi su gel di agarosio e visualizzati al transilluminatore. Anche in questo caso tutte le reazioni di PCR sono state effettuate e caricate sul gel in duplice copia, al fine di evitare il rilevamento di falsi positivi.

I gel ottenuti hanno evidenziato che lo stress termico, al pari del cadmio, è in grado di alterare l'espressione genica in embrioni di *Danio rerio*: in questo caso, però, sono stati riscontrati esclusivamente fenomeni di inibizione dell'espressione genica (*down-*

regolazione). In figura 6.3 sono riportati due gel d'agarosio nei quali è possibile osservare eventi di down-regolazione da freddo.

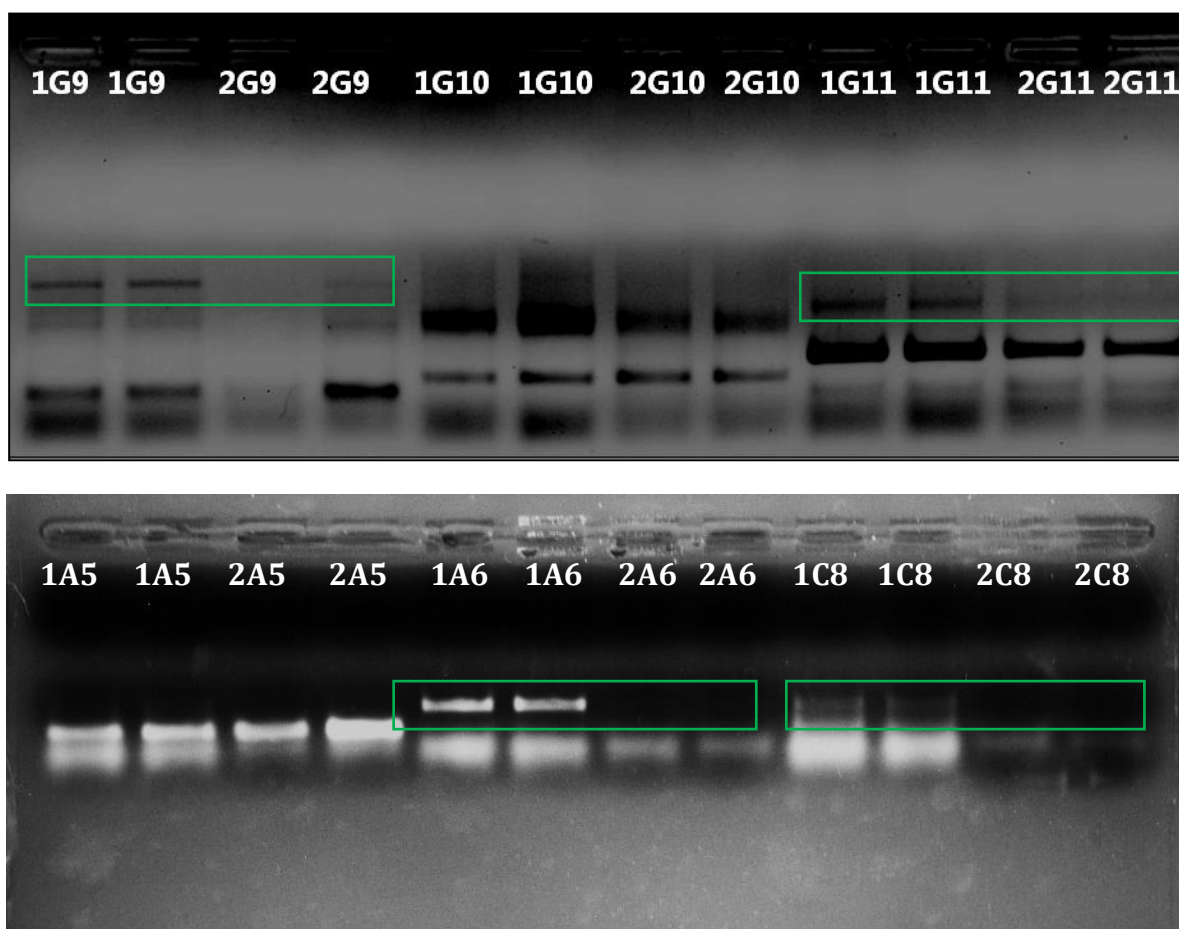


Figura 6.3: Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti ottenuti dal DDRT-PCR. Le bande down-regolate sono evidenziate in verde.

Anche in questo caso, come per l'effetto del cadmio, è stata posta maggiore attenzione alle alterazioni più evidenti, in modo da selezionare i frammenti in modo qualitativo più che quantitativo, e sono state considerate le bande con una lunghezza superiore alle 100 bp, valore limite per escludere che la banda sia un artefatto o un aggregato di primers. Nella tabella 3 sono riportate le sigle relative alle 5 bande differenzialmente espresse, rilevate dal trattamento a freddo. Le bande estratte dal gel sono state sottoposte a purificazione, come descritto in precedenza, e riamplicate tramite PCR utilizzando la stessa combinazione di primers che le ha generate nelle precedenti reazioni di DDRT – PCR. I prodotti sono stati nuovamente controllati su gel di agarosio.

Tabella 3: Elenco delle bande differenzialmente espresse in seguito a stress termico

Clone	Primers	Effetto T
1G10b	H – T ₁₁ G/H – AP10	-
1G10c	H – T ₁₁ G/H – AP10	-
1G11Lb	H – T ₁₁ G/H – AP11	-
1A6	H – T ₁₁ A/H – AP6	-
1C8Lb	H – T ₁₁ C/H – AP8	-

Identificazione dei cloni

Per l'identificazione dei trascritti in esame, si è proceduto con il clonaggio e il sequenziamento, come descritto per le analisi condotte sugli embrioni esposti al cadmio. Di seguito sono riportate le sequenze ottenute, con la relativa lunghezza in coppie di basi (bp).

1) Clone 1G10b (429 bp)

AAGCTTCCACGTAGATTGTAATGATGTTTAATCCAGCAACACGAGGATTCAAGACGCG
 CTGTAGGAAACACACATTGAAATATCGAGTATTAATTATATTCCAATTTCTTTGATCC
 ATGGTACTTTTTTTAGATGTTTTCGGTGATTTTGATCTGCGGACAAGTCAAAAGCAAG
 AGTATTGTGACTAATGTCAGGGGTTGCCATTGGTATTGCTCCACAAGTGACACTACAG
 GACTAATGCCAGCAAGAGAGAAAAAACCTGACAGAGGGGCGGTTGAACAGCACAACAG
 GATAATTTGCCAAGACAATCTGTTTGTTCATAAGTGTTTTCATTTATCGGCCCTCAG
 ACACTCGATTGGAAATACCTTACAGTAAAGCCATGAGACCAGAACATGCAAAATAAAG
 CCATTTACAAAAAAAAGCTT

3' primer oligo (dT) H-T₁₁G: AAGCTTTTTTTTTTTTG

5' random primer H-AP10: AAGCTTCCACGTA

2) Clone 1G10c (163 bp)

AAGCTTCATTCCGCTGTGGTGAACCTCTAATGAATAAGGGACTAAGCCAAATGAAAACAAGC
 AAATGTGGTTGACCTGTTTTTAAACTTGTGCTCATATAGTAAAGCATCTGTTTTTGACTT
 TTAATAATAATAAACTGAAATCTCCAAAAAAAAGCTT

3' primer oligo (dT) H-T₁₁G: AAGCTTTTTTTTTTTTG

5' random primer H-AP10: AAGCTTCCACGTA

3) Clone 1G11Lb (423 bp)

AAGCTTTTTTTTTTTGTTTGGTTTCTTTATTTACAGAGAGGATTTCGCTTGTCTGAATG
 ACACAGAAACCTTTAATATTGACATTTCCAGCATTGTAAAGCACATATTGACCTGACG
 TCCATAAACACCTCAAGACACATTTACACTAAAATCTCCAGTACACAAACGCATACAT
 ACACACACACGCGCACACACACACACACACACAGATACAACTGGCCAATTCTAAC
 AAATAACCCACTGGAATGATATCACAAGCAACTATAAAGTCACGACGTATAAACTCT
 TACTTCAAAAAACATGAAATAAACAACCTCGCGTCAATATTAAATTAAAAAAGAAAGT
 CAAATCCCACAAACAGGCATTGCACACAGCTATATTTATAGATAATATCATATTTACC
 CGAAGCTTAAGGGCGAA

3' primer oligo (dT) H-T₁₁G: AAGCTTTTTTTTTTTG

5' random primer H-AP11: AAGCTTCGGGTAA

4) Clone 1A6a (127bp)

AAGCTTGCACCATGAAGAATTTGTATTACACTGGTGGTTTACGAGTTTCAATTTGAAATAA
 ATATACCTTGGCTTTCAAGAGTAATAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAA
 AGCTT

3' primer oligo (dT) H-T₁₁A: AAGCTTTTTTTTTTTTA

5' random primer H-AP6: AAGCTTGCACCAT

5) Clone 1C8Lb (148)

AAGCTTTTACCGCCAAACGAGAAGTTCTGTCAGTTGAATTGACCGCAACAAATGTAGAATG
 ATTACACGGCTGCCCTCCCCCTACCACACATTTGAGGAGCCAGCATTCGTTCAAATTCAA
 TCAAATTAACGAGAAAAAAAAGCTT

3' primer oligo (dT) H-T₁₁C: AAGCTTTTTTTTTTTTC

5' random primer H-AP8: AAGCTTTTACCGC

Anche l'identificazione delle putative proteine codificate da questi trascritti è stata eseguita, come descritto in precedenza, interrogando la banca dati nucleotidica EMBL con i programmi informatici BLASTA E FASTA, e sono stati considerati significativi solo i dati che riportano un valore di $E < 10^{-4}$. I risultati ottenuti da tale analisi sono riportati in Tabella 4.

Tabella 4: elenco dei trascritti con elevata similarità con geni codificanti proteine note

Clone	bp	Effetto T	Similarità	Identità	Funzione biologica
1G10	429	-	Danio rerio RNA binding motif protein 38	99%	Regolazione trascrizionale
1G10	163	-	Danio rerio RNA cysteine and tyrosine-rich protein1	100%	Interazione cellulare
1G11	423	-	Danio rerio beta-synuclein	100%	Trasduzione del segnale
1A6	127	-	Danio rerio aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1a	98%	Ossidazione cellulare
1C8	148	-	Danio rerio cytochrome c oxidase subunit I	100%	Ossidazione cellulare

6.2 *Podarcis sicula*

Nel presente lavoro di tesi sono stati utilizzati embrioni di *Podarcis sicula* a differenti stadi di sviluppo al fine di verificare, sia a livello macroscopico che microscopico, i possibili effetti degli agenti stressori durante le varie fasi dell'embriogenesi

○ 6.2.1 Effetti dello stress a livello morfologico

Per quel che concerne le fasi precoci dello sviluppo di *Podarcis sicula* (5+5), i trattamenti a cui sono stati sottoposti gli embrioni indicano che le basse temperature (10°C), a differenza del cadmio, inducono letalità e non embriotossicità per quasi tutti gli embrioni analizzati. Per quanto riguarda, invece, le fasi di sviluppo più tardive (15+5), i risultati delle analisi citologiche in microscopia ottica hanno dimostrato che i due diversi fattori di stress, il cadmio ed il freddo, pur non provocando la letalità negli embrioni di *P. sicula*, il cui sviluppo continua anche durante la fase di stress, inducono alterazioni morfologiche simili a carico delle vescicole encefaliche e degli occhi in via di sviluppo, dimostrando che queste strutture sono sensibili all'effetto di stimoli stressori di diversa natura, chimica e fisica. I risultati ottenuti risultano essere in linea con i dati recenti presenti in letteratura, i quali dimostrano che le alterazioni indotte da Cd più evidenti

sono state riscontrate nell'encefalo e nell'occhio di *Podarcis*, figura (6.4) (Simoniello, Motta et al. 2011).

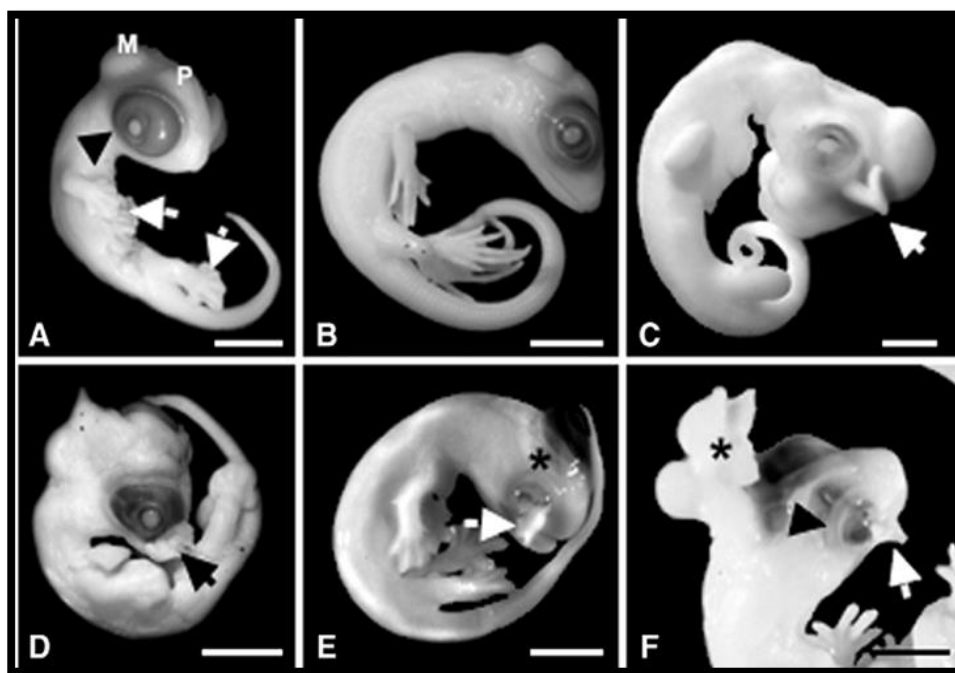


Figura 6.4: Malformazioni indotte dal cd in embrioni di *Podarcis sicula*

In particolare i tre diversi gruppi di embrioni (trattati con cadmio, incubati ad una temperatura di 10°C, controllo) sono stati analizzati a livello isto-citologico al fine di definire l'entità degli effetti esercitati dai due diversi stimoli stressori sulle vescicole encefaliche e sull'occhio. Le osservazioni dopo colorazione (emallume eosina) hanno dimostrato che negli embrioni trattati con Cd^{2+} sono presenti alterazioni a carico delle vescicole encefaliche del telencefalo, diencefalo e mesencefalo, che possono presentarsi dilatate, asimmetriche o talvolta estruse. Anche nell'occhio l'analisi citologica rivela l'esistenza di evidenti alterazioni. Alterazioni analoghe sono state evidenziate anche negli embrioni incubati a freddo.

Effetti sull'encefalo

Telencefalo: In embrioni di controllo (fig. 6.5A) i due emisferi presentano ventricoli allungati in senso dorso ventrale e slargati dorsalmente. La parete è formata da un sottile pallio nella regione dorso-mediale, uno spesso striato nella regione ventro-laterale, e da un setto nella regione ventrale. La sostanza grigia è localizzata in posizione periventricolare.

Il cadmio interferisce con lo sviluppo del telencefalo che presenta ventricoli dilatati con parete assottigliata; per il ridotto sviluppo della sostanza bianca e/o grigia lo sviluppo dei due emisferi è asimmetrico. Il telencefalo è estruso all'esterno per mancanza della volta cranica (fig. 6.5B).

Il freddo induce lievi alterazioni: il telencefalo mostra parete assottigliata e lieve asimmetria (fig. 6.5C).

Diencefalo: Negli embrioni di controllo il diencefalo (fig. 6.5D) si presenta come una vescicola impari, allungata dorso-ventralmente con ventricolo centrale, slargato medialmente e dorsalmente, in corrispondenza dell'epitalamo. La parete è costituita da uno strato di sostanza grigia piuttosto spesso e da uno strato di sostanza bianca più periferico, particolarmente spesso in posizione medio-ventrale.

Sia il trattamento con il cadmio che il freddo inducono significative alterazioni. Il diencefalo si presenta con ventricolo ridotto. La parete presenta sostanza bianca e/o grigia ridotte, interruzioni in posizione dorsale, asimmetria (fig. 6.5E). In alcuni casi la vescicola è estrusa per mancanza della scatola cranica. Dopo incubazione a freddo, in particolare il diencefalo risulta asimmetrico con ventricolo ridotto a causa della formazione di pliche che lo invadono (fig. 6.5F).

Mesencefalo: Negli embrioni di controllo il mesencefalo (fig. 6.5G) si presenta come una vescicola prominente dorsalmente, impari, con lobi ottici appena abbozzati. La parete, dorsalmente sottile, si ispessisce medialmente trapassando nel corpo in cui prevale la sostanza bianca.

I trattamenti con cadmio e con il freddo inducono significative alterazioni della vescicola mesencefalica. Gli embrioni trattati con cadmio presentano lobi ottici estrusi dalla volta cranica, e/o asimmetrici. Le alterazioni sono principalmente a carico della parete del tetto ottico, che forma pliche che invadono il ventricolo totalmente (fig. 6.5 H) o parzialmente (dato non mostrato). Dopo trattamento a freddo il mesencefalo appare estruso ed asimmetrico, il ventricolo mesencefalico risulta dilatato con presenza di pliche (fig. 6.5I).

Effetti sull'occhio

I 2 tipi di trattamento inducono evidenti alterazioni a carico della retina.

Nell'occhio di embrioni di controllo (fig. 6.6A) a circa 25 giorni dalla deposizione la retina nella regione distale al cristallino mostra un'organizzazione a 6 strati (fig. 6.6B) e

assenza di cellule in mitosi. Viceversa, nella regione prossimale al cristallino in cui la retina non è ancora stratificata le mitosi sono ancora numerose (fig. 6.6C).

Nei trattati, la retina si presenta collassata, ripiegata ad invadere l'umore vitreo (fig. 6.6D,E,G). Negli embrioni trattati con cadmio, a livello delle pliche i neuroni si presentano regolarmente disposti e si osserva un elevato numero di cellule in proliferazione rispetto alle regioni non ripiegate (fig. 6.6F). Dopo trattamento a freddo la retina si presenta anche piuttosto disorganizzata (fig. 6.6H-I).

Effetti sugli organi interni

Rispetto agli embrioni esposti al Cd (Simoniello, Motta et al. 2011) negli embrioni trattati a freddo sono state riscontrate anche evidenti alterazioni a livello degli organi interni, in particolar modo a carico dei reni e del fegato:

Effetti sul rene. Nel rene di embrioni controllo, i tubuli prossimali e distali appaiono ben differenziati e l'organizzazione cellulare è regolare (6.7 A,C). Negli embrioni trattati a freddo il rene presenta vascolarizzazione diffusa e una significativa disorganizzazione cellulare. I tubuli sono perlopiù indistinguibili data l'irregolare differenziazione del tessuto (6.7 B,D)

Effetti sul fegato. Nel fegato di embrioni controllo il parenchima epatico presenta un'organizzazione cellulare regolare e il tessuto appare ben differenziato (6.7 E,G). Negli embrioni trattati si notano epatociti molto dilatati e vacuolarizzati. Il tessuto è più vascolarizzato (6.7 F,H).

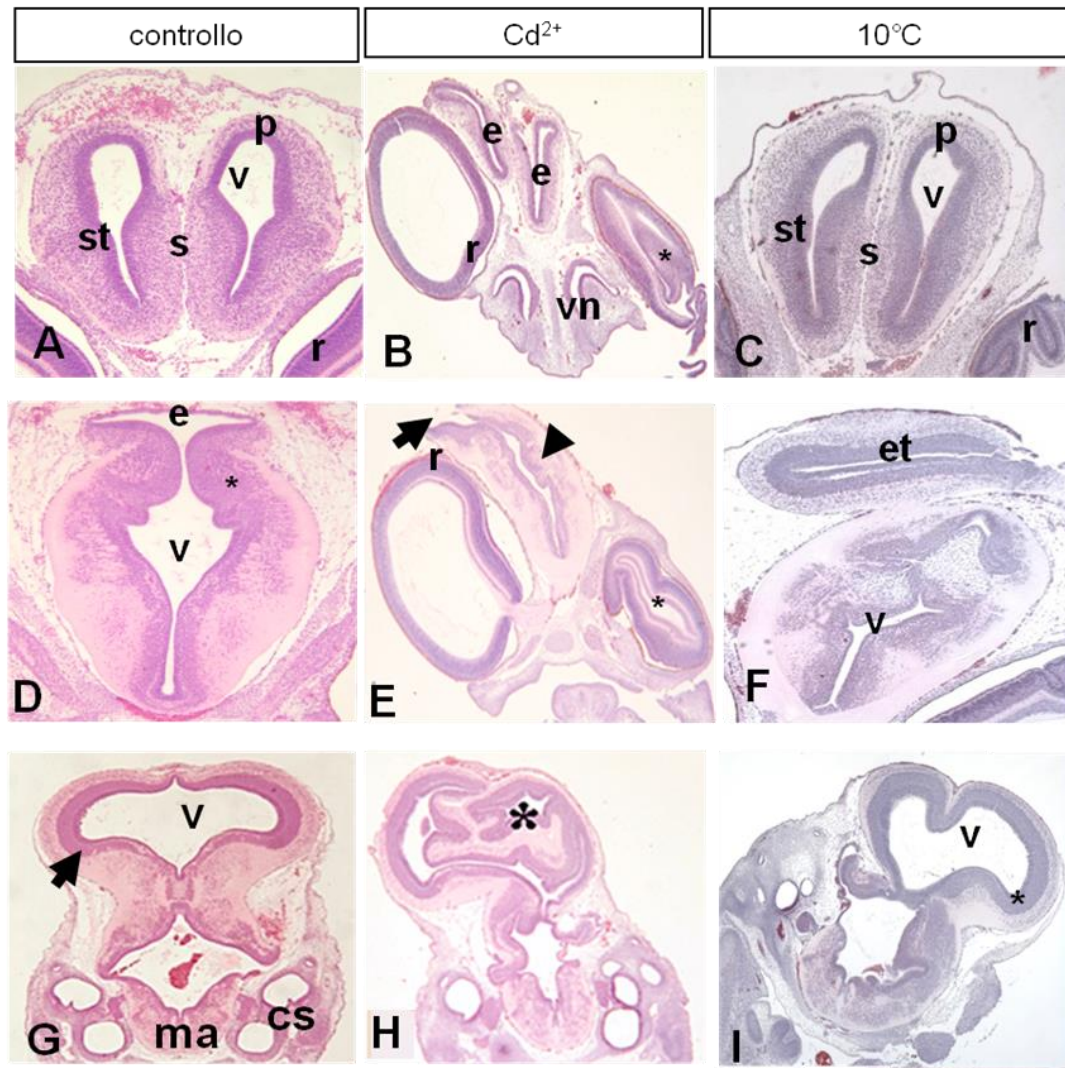


Figura 6.5: alterazioni indotte dal cadmio e da shock termici nell'encefalo.

(A) telencefalo di embrione controllo: emisferi telencefalici con ventricoli (v) slargati dorsalmente. Si notano il sottile pallio (p) mediale e dorsale, lo striato (st) e il setto (s). Retina (r). (B) telencefalo in embrione trattato con Cd^{2+} : si nota asimmetria dei 2 emisferi(e) accompagnata da una riduzione di spessore della parete e dall'estrusione dalla scatola cranica. Occhio con significative alterazioni (*). Organi vomero nasali (vn) e retina normali (r). (C) telencefalo in embrione incubato a 10 °C: si nota leggera asimmetria dei 2 emisferi con striato e setto sottili. (D) diencefalo in embrione di controllo: vescicola diencefalica, impari e mediana, allungata in senso dorso-ventrale, con ventricolo (v) slargato medialmente e in corrispondenza dell'epitalamo (e). La sostanza grigia (*) è particolarmente sviluppata nelle regioni dorso-laterali, la sostanza bianca nelle regioni ventrali. (E) diencefalo in embrione trattato con Cd^{2+} : vescicola dislocata in posizione asimmetrica, aperta dorsalmente (freccia) ed estrusa dalla scatola cranica. La parete ha spessore uniforme e scarso sviluppo della sostanza grigia (punta di freccia). (*) occhio con retina ripiegata. (F) diencefalo in embrione incubato a 10 °C : vescicola asimmetrica con ventricolo ridotto, con pliche che lo invadono; sovrastato dall' emisfero telencefalico (et). (G) mesencefalo in embrione di controllo: mesencefalo ancora impari, dorsalmente slargato con lobi ottici in formazione. La sostanza grigia (freccia) dorsale è addossata al ventricolo (v), quella ventrale è organizzata in nuclei sparsi nel corpo. Midollo allungato (ma), canali semicirculari (cs). (H) mesencefalo in embrione trattato con Cd^{2+} : vescicola con parete che ha invaso il ventricolo (*). (I) mesencefalo in embrione incubato a 10 °C: vescicola asimmetrica ed estrusa, il ventricolo (v) appare dilatato con presenza di pliche.

Riprese a: A-I: 5x. Colorazione con emallume-eosina

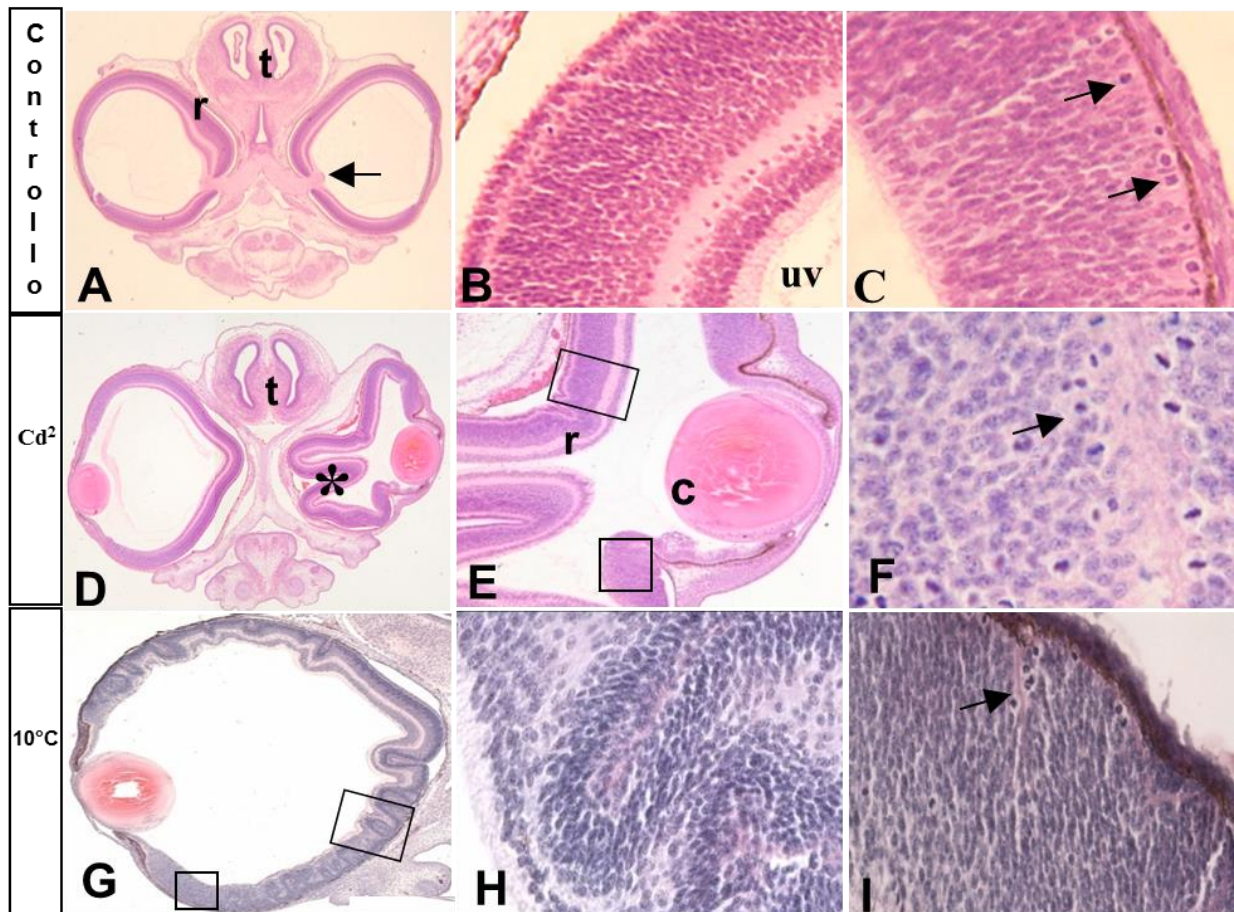


Figura 6.6: alterazioni indotte dal cadmio e da shock termico nell'occhio.

(A) occhio in embrioni di controllo: occhio con retina (r) indifferenziata nella regione prossimale al cristallino e parzialmente stratificata nella regione distale. Emergenza del nervo ottico (freccia), telencefalo (t). (B) Retina distale stratificata. Umore vitreo (uv). (C) retina prossimale non stratificata (*) con cellule in mitosi (freccie). (D) occhio in embrione trattato con Cd^{2+} : si nota la retina ripiegata (*); il telencefalo (t) è normale. (E) particolare; retina (r) regolarmente stratificata, cristallino (c). (F) ulteriore particolare che mostra le numerose cellule in mitosi (freccia). (G) occhio in embrione incubato a 10°C : nota la retina ripiegata. (H) particolare della retina in cui si nota una disorganizzazione nella stratificazione. (I) particolare della figura G: si notano cellule in mitosi.

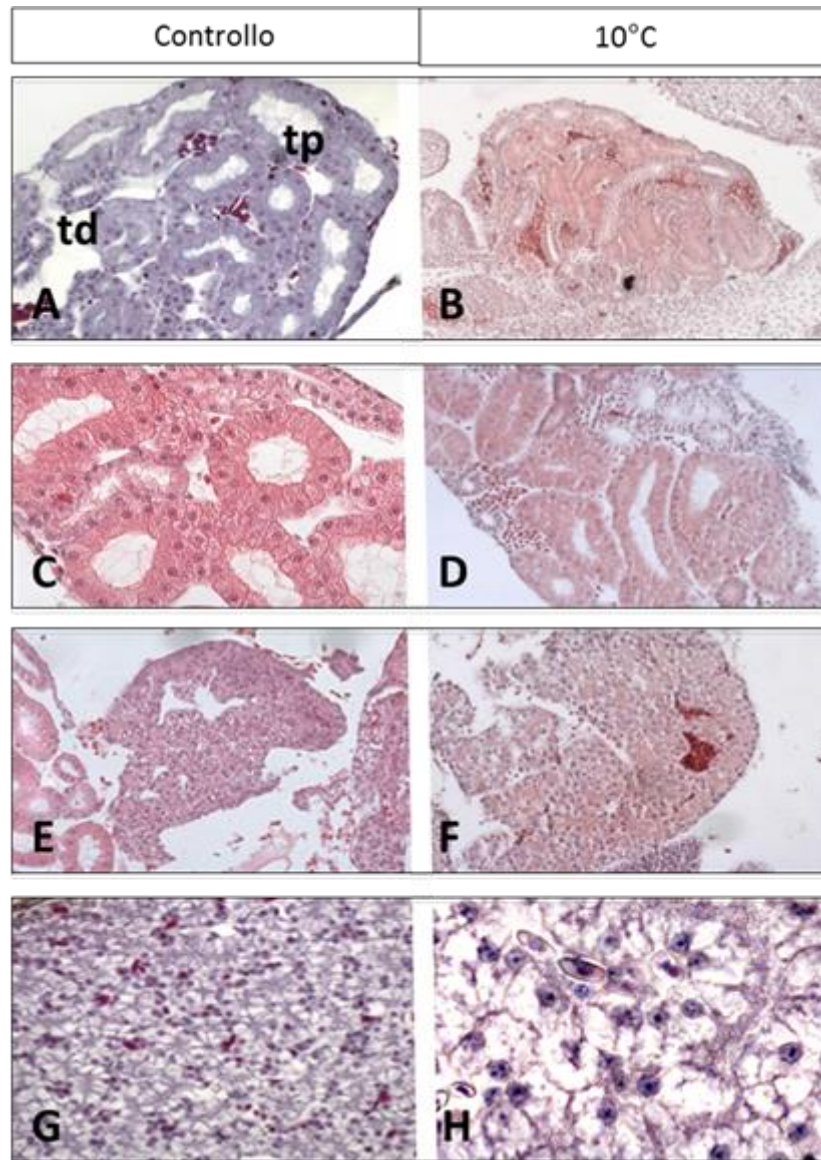


Figura 6.7: Alterazioni indotte da shock termici nel fegato e nel rene.

(A) Rene in embrione di controllo: tubuli prossimali (tp) e distali (td) ben differenziati. **(B)** Rene in embrione incubato a 10 °C: si nota vascolarizzazione diffusa. **(C)** Particolare di rene in embrione di controllo: i tubuli appaiono ben differenziati e l'organizzazione cellulare è regolare. **(D)** Particolare di rene in embrione incubato a 10 °C: evidente disorganizzazione cellulare e tubuli difficilmente distinguibili data l'irregolare differenziazione. **(E)** Fegato in embrione di controllo: organizzazione cellulare regolare e tessuto ben differenziato. **(F)** Fegato in embrione incubato a 10 °C: il tessuto appare vascolarizzato. **(G)** Parenchima epatico in embrione di controllo: organizzazione cellulare regolare. **(H)** Parenchima epatico in embrione incubato a 10 °C: gli epatociti sono molto dilatati, vacuolizzati, privi di citoplasma. Il tessuto appare vascolarizzato.

Riprese a: A, B, E, F: 10x; C, D, G, H: 20x. Colorazione con emallume-eosina.

○ 6.2.2 Effetti dello stress a livello molecolare

Gli esperimenti condotti nel corso di questo lavoro di tesi confermano una chiara alterazione dell'espressione genica negli embrioni di *Podarcis sicula* sottoposti a stress, evidenziando principalmente che le alterazioni coinvolgono, anche in questo caso come per *Danio rerio*, lo sviluppo del sistema nervoso, l'integrità delle membrane cellulari e i meccanismi di regolazione genica.

Effetto del Cadmio sull'espressione genica in embrioni di *Podarcis sicula*

Dati bibliografici recenti dimostrano che dal punto di vista molecolare, in embrioni di *Podarcis* incubati per 20 giorni in terreno contaminato con cadmio (Trinchella, Cannetiello et al. 2010), si osserva un'alterazione dell'espressione di trascritti coinvolti nella struttura della membrana plasmatica e nella regolazione dell'espressione genica in generale. Gli effetti teratogeni del cadmio sembrano quindi manifestarsi direttamente, modificando l'equilibrio elettrochimico della membrana e agendo su fattori trascrizionali correlati a geni strettamente legati allo sviluppo embrionale, ed indirettamente, causando una serie di meccanismi a catena che regolano attività cellulari e geni fondamentali dell'embriogenesi.

Effetto del freddo sull'espressione genica in embrioni di *Podarcis sicula*

La tecnica del mRNA *Differential Display* è stata utilizzata anche per valutare i possibili effetti di uno shock termico (in questo caso un brusco raffreddamento della temperatura di incubazione) sull'espressione genica in embrioni di *Podarcis*. Anche in questo caso il primo step è stato l'estrazione dell'RNA totale da embrioni controllo e sottoposti a stress termico. Le due popolazioni di RNA sono state trattate con DNAsi I; dopodiché si è proceduto all'osservazione dell'RNA su gel di agarosio per stabilirne l'integrità e la pulizia; la concentrazione finale è stata determinata mediante spettrofotometria a 260 nm. Così come è stato descritto in precedenza per l'analisi dei trascritti dopo i trattamenti degli embrioni di *Danio*, dalle due popolazioni di RNA sono state preparate tre subpopolazioni di cDNA a singolo filamento mediante retrotrascrizione, utilizzando tre diversi 3'-oligo (dT) (H - T₁₁A, H - T₁₁G, H - T₁₁G) come primer d'innescio della reazione, e i diversi cDNA sono stati sottoposti ad amplificazione per PCR. In questo caso, combinando le sequenze dei 5'-random primer arbitrari (HAP_n), descritti in tabella

5, e dei 3'-oligo(dT) ancorati precedentemente mostrati, sono state condotte reazioni di PCR per un totale di 12 combinazioni.

Tabella 5. Combinazioni dei 5'- random primer arbitrari (HAP_n) e dei 3'-oligo(dT) mostrati in tabella 4

Primer	Sequenze
H-AP1	AAGCTTGATTGCC
HAP-2	AAGCTTCGACTGT
HAP-5	AAGCTTAGTAGGC
HAP-6	AAGCTTGCACCAT
HAP-7	AAGCTTAAGCAGG

I prodotti di PCR sono stati separati per elettroforesi su gel di agarosio e visualizzati al transilluminatore. Anche in questo caso tutte le reazioni di PCR sono state condotte e caricate sul gel in duplice copia, al fine di evitare il rilevamento di falsi positivi. I gel ottenuti hanno evidenziato che lo stress termico, al pari del cadmio, è in grado di alterare l'espressione genica in embrioni di *Podarcis*: anche in questo caso sono stati riscontrati sia fenomeni di inibizione dell'espressione genica (*down-regolazione*) che di attivazione (*up-regolazione*). In figura 6.8 sono riportati due esempi di bande differenzialmente espresse in seguito a trattamento con il freddo.

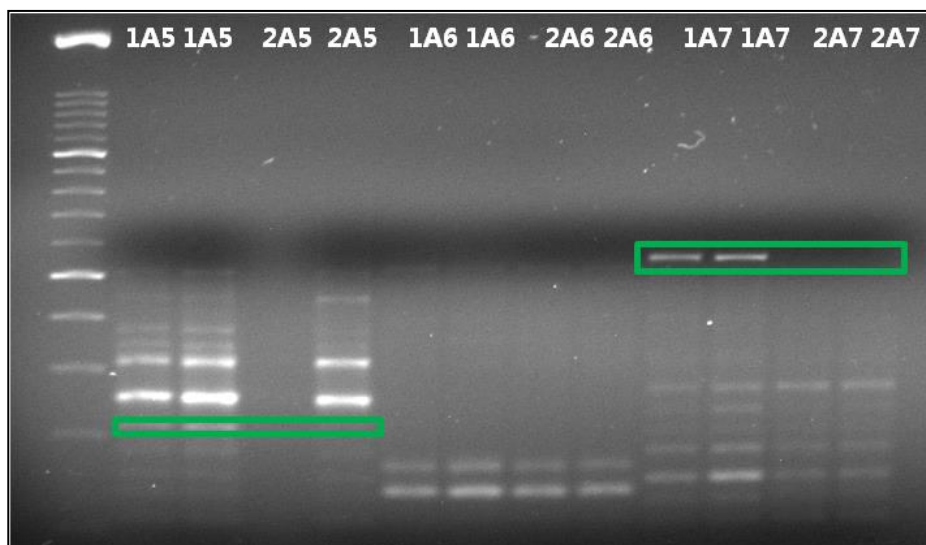


Figura 6.8: Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti ottenuti dal DDRT-PCR. Le bande down-regolate sono evidenziate in verde.

Anche in questo caso, è stata posta maggiore attenzione alle alterazioni più evidenti, in modo da selezionare i frammenti in modo qualitativo più che quantitativo, e sono state considerate le bande con una lunghezza superiore alle 100 bp, valore limite per escludere che la banda sia un artefatto o un aggregato di primers.

Nella tabella 6 sono riportate le sigle relative alle bande differenzialmente espresse, rilevate dal trattamento a freddo.

Tabella 6: Elenco delle bande differenzialmente espresse in seguito a stress termico.

Clone	Primers	Effetto Stress Termico
2C1	H-T ₁₁ C/H-AP 1	+
2G2	H-T ₁₁ G/H-AP 2	+
1A5	H-T ₁₁ A/H-AP 5	-
1A7	H-T ₁₁ A/H-AP 7	-

Le bande estratte dal gel sono state sottoposte a purificazione, come descritto in precedenza, e riamplicate tramite PCR utilizzando la stessa combinazione di primers che le ha generate nelle precedenti reazioni di DDRT – PCR. I prodotti sono stati nuovamente controllati su gel di agarosio.

Identificazione dei cloni

Per l'identificazione dei trascritti in esame, si è proceduto con il clonaggio e il sequenziamento, come descritto per le analisi condotte sugli embrioni di *Danio rerio*.

Per quanto riguarda i cloni 2C1, 2G2 e 1A5, questi non hanno dato alcuna similarità con sequenze geniche già annotate nelle banche dati (*no significant hits found*); ciò suggerisce che questi frammenti possono appartenere a geni codificanti per proteine non ancora identificate, oppure possono corrispondere a regioni non tradotte di RNA messaggeri, che come è noto, sono meno conservate nel corso dell'evoluzione.

Di seguito è stata, invece, riportata la sequenza ottenuta per il clone 1A7, con la relativa lunghezza in coppie di basi (bp).

Clone 1A7 (539 bp)

AAGCTTAACGAGGCATGCAGCACGAGAATATAAACTAAATTCAGTGAAAGGTGCTCACGAAC
 CTGGGGAGATATCACCTGTACATATATAACAAGGAGGTCGATGAGAACACGAATGAATCTG
 AAGGAGACCTCTGACTTAAAGCTTGAACCAAATATGCTGAATAGCTATAAAAACAATTTGAC
 TGGCGTGAGAACCGATAGCTTGGAGGAGCAATCTCTTGTGATGCACGAGAGTGAGCAGGCTC
 ATGGGACATCACACAAGCGGGAGGGTAGGTGTCAGAAGAGTGACAGGGTTGTGGCCAAAAG
 AAATCCCGACAAGGAAGACTGGTGAAGCCATCTTTGAAAACGGAGGAACTGATCCTGCACA
 CAACTTGTCTGGCAAGGACAAAGTGCCAGATTTGATCAGTTCACGTTCTGACCTAGGAGAGA
 TGAACAATGTTGTGGATTTCAGCCATTGGCTATAAAGACTGCATCCCTTCCTCCGGTGGCTGC
 TCCATTGTGACTTCGGACACTTTCAAAGTAAAGGACCGTTTTAGAACTACAAAAAGTAAAAA
 AAAAAAGCTT

Anche l'identificazione della putativa proteina codificata da questo trascritto è stata eseguita, come descritto in precedenza, interrogando con i programmi informatici BLASTA E FASTA, la banca dati nucleotidica EMBL, e sono stati considerati significativi solo i dati che riportano un valore di $E < 10^{-4}$.

Il genoma e il trascrittoma dei Rettili è noto solo per una piccola parte, e ciò comporta che le sequenze nucleotidiche di origine rettiliana presenti nel *database* siano incomplete ed ancora in numero esiguo per essere sottoposte ad un esauriente confronto. Quindi, come in qualche modo previsto, la similarità rinvenuta riguarda la sequenza di un organismo appartenente ad una differente classe di Vertebrati (*Gallus gallus*) e non sequenze nucleotidiche analoghe o fileticamente affini a quelle della classe sistematica di appartenenza di *Podarcis sicula*.

Tabella 7: Trascritto con elevata similarità ad un gene codificante una proteina nota

Clone	Pb	Effetto Freddo	Similarità	Identità	Funzione Biologica
1A7	539	-	<i>Suppressor of variegation (SUV)4-20 homolog 1 Gallus</i>	70%	Regolazione Post-trascrizionale

Capitolo 7

Risultati II^a Parte

*Analisi dell'espressione di geni connessi
allo stress e all'embriogenesi*



Proteine a funzione citoprotettiva in *Danio rerio*

- Localizzazione dell'RBBP6-mRNA
- Localizzazione di Cryl1-mRNA



Proteine a funzione citoprotettiva in *Podarcis sicula*

- Localizzazione dell'MT-mRNA
- Localizzazione dell'HSP70-mRNA

7.1 Proteine a funzione citoprotettiva in *Danio rerio*

Nell'ottica di definire il profilo molecolare di geni associati alle alterazioni indotte da stress durante l'embriogenesi di vertebrati non mammiferi è stata valutata l'espressione di messaggeri codificanti proteine implicate sia in processi fisiologici che di adattamento allo stress, quali *Lambda1-crystallin protein* e *Retinoblastoma Binding Protein 6*, i cui trascritti sono stati precedentemente identificati attraverso esperimenti di *Differential Display*. In particolare Cryl1 è un membro della famiglia delle proteine del cristallino, che numerosi studi ritraggono come “*chaperon* molecolari” importanti per il corretto funzionamento cellulare (Jakob, Gaestel et al. 1993; Sax and Piatigorsky 1994; Van Montfort, Slingsby et al. 2001); Rbbp6 è invece un trascritto importante nella regolazione della proliferazione cellulare (Chibi, Meyer et al. 2008; Kappo, Ab et al. 2012) e pertanto svolge un ruolo di rilevanza sia nei meccanismi di sviluppo che nei meccanismi di difesa cellulare.

Sperimentalmente, l'espressione dei messaggeri per proteine a funzione citoprotettiva è stata analizzata mediante indagini di ibridazioni *in situ*, utilizzando sonde omologhe ai trascritti endogeni. La localizzazione di questi ultimi è stata valutata, in particolar modo, nell'occhio di esemplari adulti di *Danio rerio* esposti a concentrazioni di cadmio riscontrate essere tossiche e non letali per gli organismi analizzati.

Si è scelto di focalizzare la nostra attenzione sulla struttura oculare in quanto sappiamo essere particolarmente inficiata dal trattamento con il cadmio (Chow, Hui et al. 2008); inoltre l'utilizzo degli esemplari adulti è risultato necessario per consentire una precisa distinzione e localizzazione della presenza del trascritto in una struttura più facilmente discriminabile nelle sue componenti come può certamente risultare l'occhio di un organismo adulto rispetto all'occhio di un embrione.

○ 7.1.1 Localizzazione dell' RBBP6-mRNA

Le sezioni di retina degli esemplari controllo (fig. 7.1A) sono risultate sempre negative all'ibridazione, così come le retine degli esemplari trattati con dosi ambientali e non tossiche di cadmio (<3microM) (fig. 7.1B). Gli esemplari trattati con 20microM di cadmio per 30 giorni, viceversa, presentano nella porzione ventrale della retina una marcatura del citoplasma delle cellule gangliari e delle cellule amacrine, localizzate nella porzione più interna dello strato nucleare interno (fig. 7.2A). Nella porzione equatoriale della

retina, si nota inoltre, la presenza di marcatura nei nuclei delle cellule bipolari, soprattutto nelle regioni più prossimali al nervo ottico (fig. 7.2C-E). Nella porzione distale, posteriore e anteriore, si evidenzia la presenza di un gruppo di cellule intensamente marcate (fig. 7.2D). Nella regione mediana, la positività sullo strato nucleare interno è debole e diffusa. Sugli strati plessiformi (interno ed esterno), gangliari e nei fotorecettori non si nota invece alcuna marcatura significativa (fig. 7.2B-F). Gli esemplari di *Danio rerio* esposti 40 microM di cadmio per 6 giorni presentano una retina intensamente marcata. Nella sezione equatoriale, la marcatura si localizza nei due strati nucleari, (fig. 7.3A-B), in corrispondenza dei nuclei e del citoplasma perinucleare dei fotorecettori e delle cellule bipolari (fig. 7.3B-C). Si nota, invece, l'assenza di marcatura sullo strato gangliare e sul plessiforme interno ed esterno (fig. 7.3 D). Gli esemplari di *Danio rerio* trattati con 40 microM di cadmio per 6 giorni ed esposti poi a 7g di recupero, mostrano una situazione che sembra ricondursi essenzialmente al trattamento con 20 microM di cadmio, precedentemente descritto. Infatti nella retina di questi embrioni sottoposti a "recupero" la marcatura si localizza preferenzialmente nei nuclei delle cellule bipolari dello strato nucleare interno (fig. 7.4 A-B), mentre il segnale scompare dallo strato nucleare esterno.

Nel fegato, intestino, pancreas e ovociti, degli esemplari esposti a 20 microM di cadmio per 30 giorni, non si riscontra la presenza di marcatura (fig. 7.5 A-B). Negli esemplari esposti a 40 microM di cadmio per 6 giorni, si osserva invece la comparsa di una marcatura nel citoplasma degli ovociti in vitellogenesi (fig. 7.5C), negativi gli ovociti in crescita primari, come anche il fegato e il pancreas (fig. 7.5D).

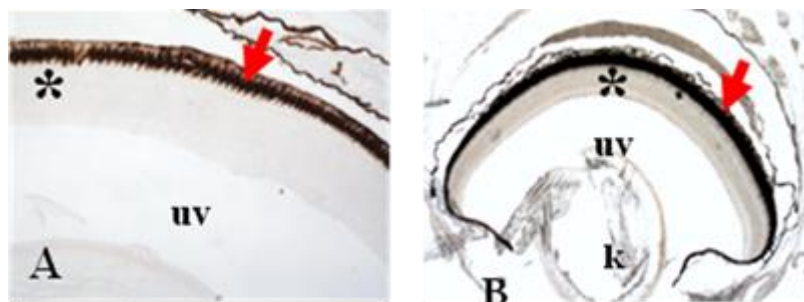


Figura 7.1: Localizzazione dell'RBBP6-mRNA nella retina di *Danio rerio*.

Espressione di Rbbp6 in retina di *Danio rerio* controllo **(A)** e trattato con <3 microM di cadmio **(B)**: in entrambi si nota l'assenza di marcatura in tutte le regioni della retina (*) e in tutti i tipi cellulari. Si nota chiaramente l'epitelio pigmentato esterno (freccia), il cristallino (k) e l'umore vitreo (uv).

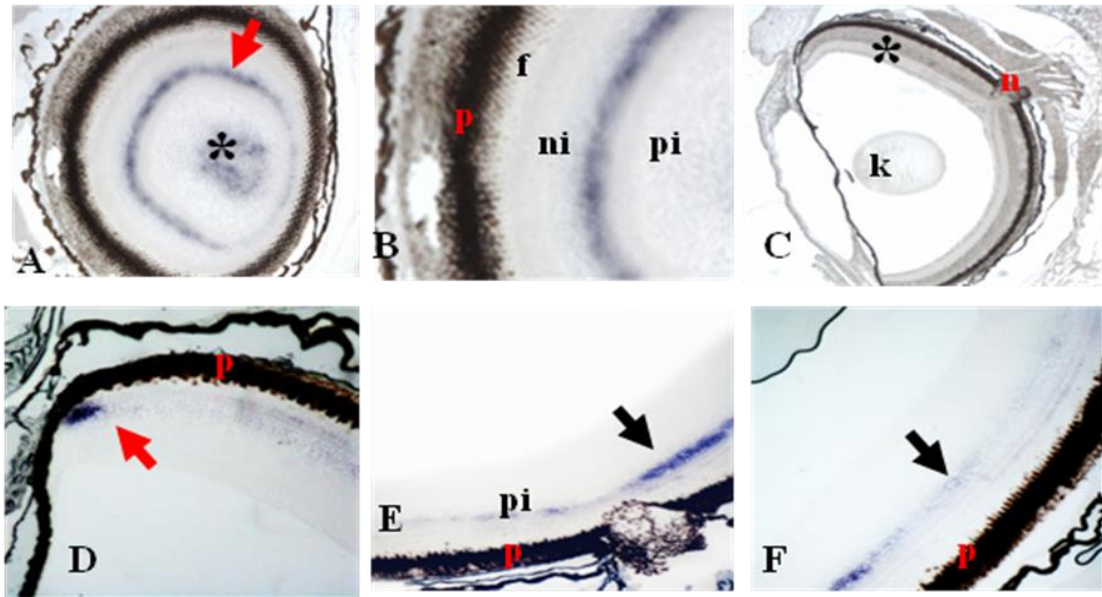


Figura 7.2: Localizzazione dell'RBBP6-mRNA nella retina di *Danio rerio* esposto a 20 microM Cd per 30 giorni. A) retina ventrale, con marcatura localizzata nel citoplasma delle cellule gangliari (*) e nel citoplasma delle cellule amacrine, localizzate nello strato nucleare interno (freccia). B) dettaglio in cui si nota l'assenza di marcatura nello strato plessiforme interno (pi) e nello strato dei fotorecettori (f). C) piano equatoriale della retina, in corrispondenza del nervo ottico (n). Si nota la presenza di marcatura nella regione prossimale al nervo ottico (freccia). Cristallino (k). D) dettaglio della porzione distale posteriore, si nota un gruppo di cellule intensamente marcate (freccia) e la presenza di una debole e diffusa marcatura sulle cellule dello strato nucleare interno E) retina prossimale al nervo ottico; la marcatura è intensa e localizzata soprattutto in corrispondenza dello strato nucleare interno (freccia). Negativi gli strati gangliari e plessiforme interno (pi). F) retina mediale anteriore; debole marcatura diffusa sui nuclei delle cellule dello strato nucleare interno (freccia). Strato delle cellule pigmentate (p).

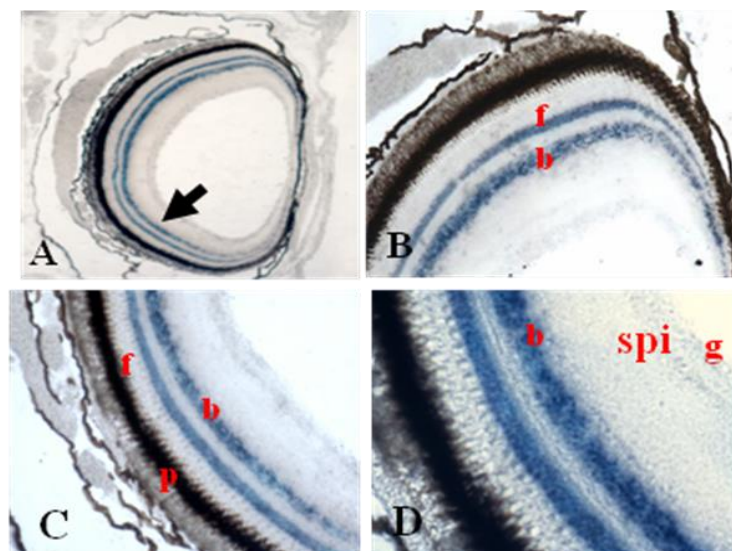


Figura 7.3: Localizzazione dell'RBBP6-mRNA nella retina di *Danio rerio* esposto a 40 microM Cd per 6 giorni. A) sezione subequatoriale con marcatura localizzata nei due strati nucleari (freccia). dettaglio della porzione distale B) e prossimale C) in cui si nota la marcatura sul citoplasma perinucleare dei fotorecettori (f) e delle cellule bipolari (b). D) ulteriore dettaglio in cui si nota l'assenza di marcatura sullo strato gangliare (g), plessiforme interno (spi). Strato delle cellule pigmentate (p).

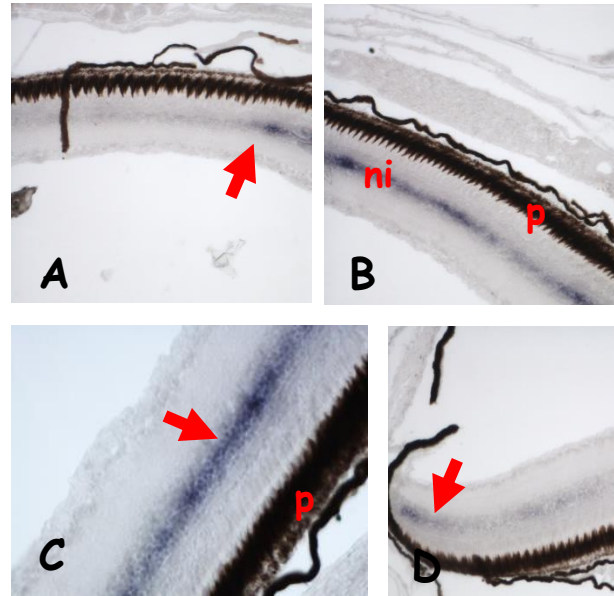


Figura 7.4: Localizzazione dell'RBBP6-mRNA in retina di *Danio rerio* esposto a 40 microM di cadmio per 6 giorni ed esposti poi a 7g di recupero.

A) e B) dettagli della regione mediale e prossimale rispettivamente in cui si nota la comparsa (freccia) di una intensa marcatura sullo strato nucleare interno, in corrispondenza dei nuclei delle cellule bipolari. **C)** ulteriore dettaglio della regione prossimale in cui si nota la localizzazione della marcatura nei nuclei delle bipolari (freccia). **D)** porzione distale anteriore in cui si nota la presenza di un gruppo di cellule più intensamente marcate (freccia).

Strato delle cellule pigmentate (p).

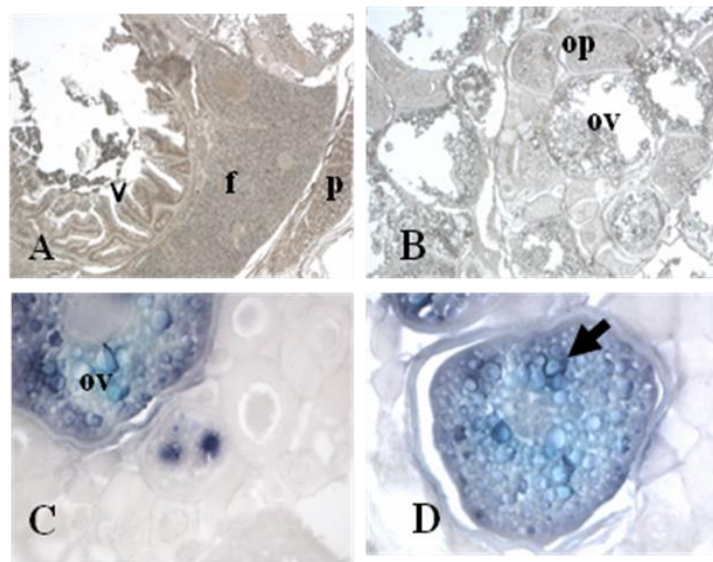


Figura 7.5: Localizzazione dell'RBBP6-mRNA in fegato e intestino (A) e ovaio (B-D), di *Danio rerio* esposto a cadmio. A-B) Cd 20 microM per 30 giorni. Non si osserva la presenza di marcatura in nessuno dei tessuti esaminati. Fegato (f), intestino con villi (v), pancreas (p), ovociti in crescita primaria (op) e vitellogenesi (ov). C) Cd 40 microM per 6 giorni. Comparsa di marcatura nel citoplasma degli ovociti in vitellogenesi (ov) ma non in crescita primaria (op). D) dettaglio di ovocita in vitellogenesi. Si notano i globuli di vitello circondati da una intensa marcatura (freccia).

○ 7.1.2 Localizzazione di Cryl1-mRNA

Le sezioni di retine degli animali di controllo (fig. 7.6A) e trattati con dosi <3 microM di cadmio per 30 giorni (fig. 7.6B), risultano sempre negative all'ibridazione.

Nelle retine di *Danio rerio* esposti a 20 microM di cadmio per 30 giorni, si nota la comparsa di marcatura negli strati nucleari interno ed esterno (fig. 7.7A). Nello strato nucleare esterno, in particolare, la marcatura si localizza sui nuclei dei bastoncelli e, in minor misura sul citoplasma dei coni (fig. 7.7A-B). Si osserva marcatura, anche sui nuclei di alcune cellule dello strato gangliare e sulle fibre dello strato ottico (fig. 7.7D). La presenza di alterazioni strutturali non sembra modificare l'espressione del trascritto (fig. 7.7C). Nella retina di *Danio rerio* esposto a 40 microM di cadmio per 6 giorni, si nota la marcatura negli strati nucleari interno ed esterno (fig. 7.8A), mentre manca completamente nello strato gangliare e plessiforme interno (fig. 7.8B). Si osserva, invece, marcatura anche sui nuclei e sul citoplasma perinucleare dei coni e nei nuclei delle cellule bipolari (fig. 7.8C). Fegato, intestino e gonadi dei controlli sono sempre negativi (risultato non mostrato). Dopo esposizione a 40 microM di cadmio per 6 giorni, si osserva che gli enterociti, le cellule mucipare e gli epatociti sono sempre negativi mentre la marcatura compare a livello di alcuni nuclei delle cellule della lamina basale connettivale, presente alla base della mucosa (fig. 7.9 A). Il trattamento con 20 microM di cadmio genera nell'ovocita positività alla marcatura in corrispondenza del citoplasma che circonda i globuli di vitello. (fig. 7.9B),

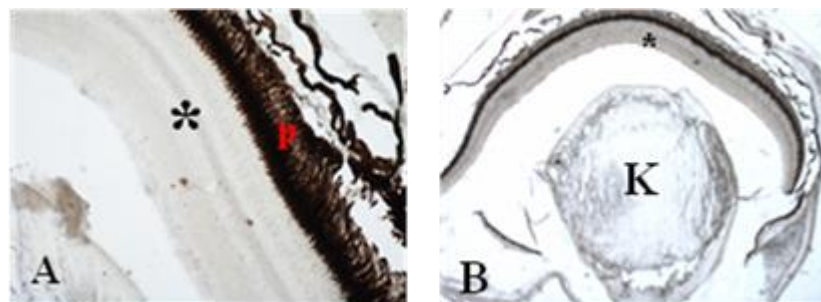


Figura 7.6: Localizzazione di Cryl1-mRNA nella retina di *Danio rerio*.

Retina di *Danio rerio* controllo **(A)** e trattato con <3 microM di cadmio per 30 giorni **(B)**: in entrambi si nota l'assenza di marcatura in tutte le regioni della retina (*).

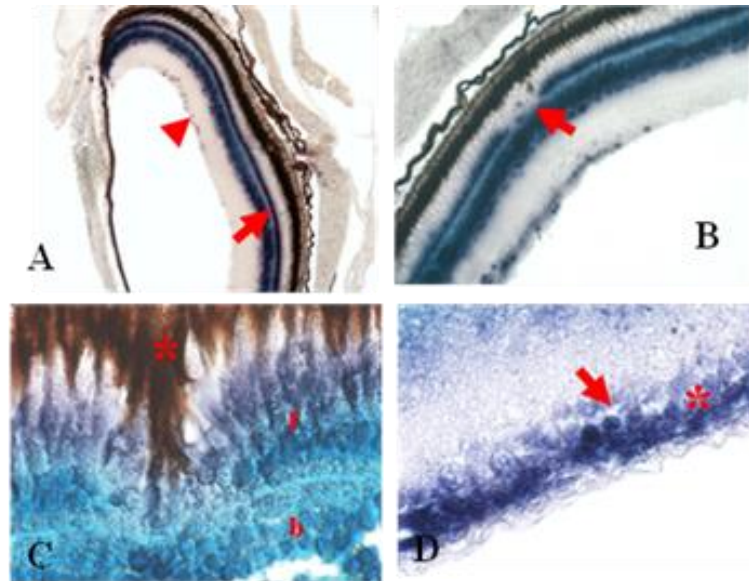


Figura 7.7 Localizzazione di Cry11-mRNA nella retina di *Danio rerio* esposto a 20 µM di cadmio per 30 giorni. A) sezione equatoriale; Si nota marcatura negli strati nucleari interno ed esterno (freccia) e nello strato gangliare (punta di freccia). B) dettaglio in cui si nota la presenza di una interruzione nello strato nucleare esterno (freccia). C) dettaglio di retina alterata, si riconosce una microplica (*) dell'epitelio pigmentato che si insinua nello strato nucleare interno. La marcatura non subisce alterazioni: si presenta sui nuclei delle cellule bipolari (p) e sul citoplasma e nei nuclei dei coni (c). D) marcatura sui nuclei di alcune cellule dello strato gangliare (freccia) e sulle fibre dello strato ottico (*).

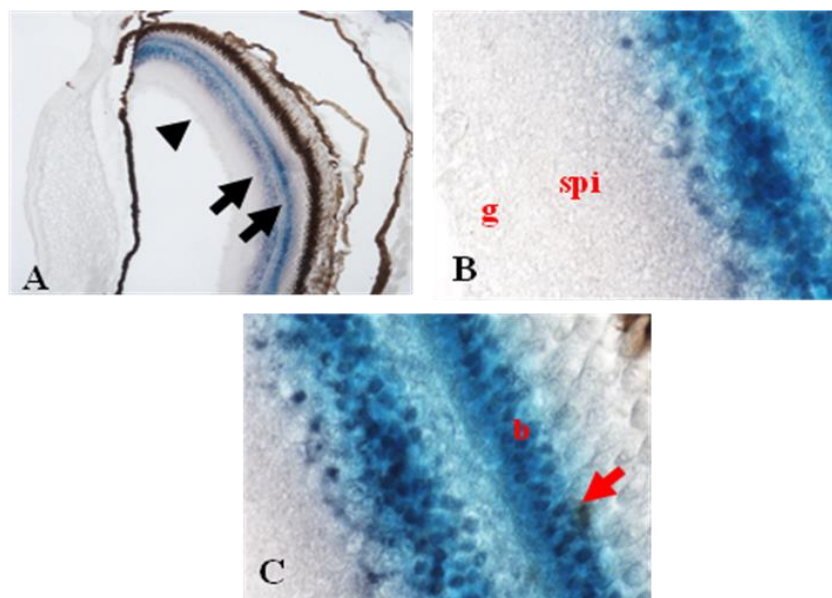


Figura 7.8 Localizzazione di Cry11-mRNA nella retina di *Danio rerio* esposto a 40 µM di cadmio per 6 giorni. A) sezione quasi equatoriale; La marcatura è localizzata sugli strati nucleari interno ed esterno (freccia). Assente la marcatura nello strato gangliare (punta di freccia). B) dettaglio della porzione interna della retina con lo strato gangliare e plessiforme interno negativi. Si nota invece la marcatura su alcuni nuclei delle cellule bipolari (freccia), le cellule amacrine sono negative. C) ulteriore dettaglio della porzione esterna della retina. La marcatura è presente nei nuclei e nel citoplasma perinucleare dei bastoncelli e nei nuclei delle cellule bipolari (b) (freccia).

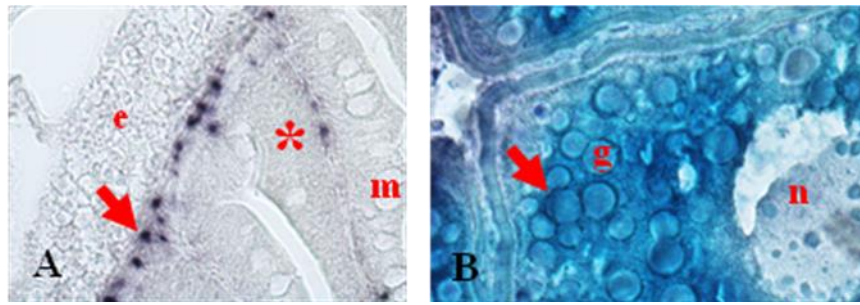


Figura 7.9: Localizzazione di Cryl1-mRNA in fegato e intestino a 40 microM di cadmio per 6 giorni (A) e in ovaio di *Danio rerio* esposto a 20 microM di cadmio per 30 giorni (B).

A) sezione d'intestino, marcatura a livello di alcuni nuclei (freccia) della lamina basale connettivale presente alla base della mucosa. Gli enterociti (*), le cellule mucipare (m) e gli epatociti (e) sono sempre negativi. **B)** Ovocita in vitellogenesi; i globuli di vitello (g) sono circondati da un citoplasma intensamente marcato (freccia). Nucleo (n).

7.2 Proteine a funzione citoprotettiva in *Podarcis sicula*

Sempre nell'ottica di associare l'espressione genica alle alterazioni indotte da stress durante lo sviluppo embrionale di vertebrati non mammiferi è stata valutata l'espressione di messaggeri codificanti proteine a funzione protettiva. La cellula infatti è dotata di meccanismi di protezione, attivati in risposta a stimoli che alterano l'omeostasi cellulare. In particolare l'attenzione è stata rivolta a due classi di proteine a funzione protettiva, le metallotioneine e le *heat shock proteins*. Il corretto funzionamento di queste proteine è infatti una condizione indispensabile affinché avvenga un corretto sviluppo embrionale. Inoltre poichè numerose ricerche sulle MT e HSPs sono state condotte in embrioni di organismi acquatici e di mammiferi, poco si conosce relativamente all'espressione di queste proteine negli embrioni degli amnioti ovipari. Si è proceduto, pertanto, a verificare la presenza dei messaggeri codificanti le metallotioneine e le HSPs e ad esaminarne le variazioni in termini di espressione e localizzazione durante l'accrescimento embrionale, in una specie, come quella di *Podarcis sicula*, frequentemente colpita in natura da diversi stress ambientali poiché vive in aree fortemente antropizzate.

Sperimentalmente, l'espressione dei trascritti per proteine a funzione citoprotettiva è stata analizzata mediante indagini di ibridazioni *in situ*, utilizzando sonde omologhe ai trascritti endogeni. In particolare, per quanto riguarda la localizzazione dell'MT, è stato utilizzato un frammento genico precedentemente clonato e sequenziato nel laboratorio presso il quale è stato svolto il presente lavoro di tesi (Simoniello, Motta et al. 2010).

L'espressione dell'Hsp70 è stata invece valutata avvalendoci di una sequenza nucleotidica identificata attraverso metodiche di biologia molecolare che hanno previsto:

- 1) Costruzione di allineamenti nucleotidici relativi al trascritto di interesse, in specie filogeneticamente affini a *Podarcis sicula*, necessari per la costruzione di primers sequenza-specifici, non essendo ancora annotato in banca dati il genoma completo del lacertide nostro oggetto di studio;
- 2) Amplificazione della sequenza nucleotidica relativa al trascritto di interesse utilizzando primers specifici su templati di cDNA (RT-PCR);
- 3) Valutazione dei prodotti di amplificazione attraverso corsa elettroforetica, purificazione, clonaggio e sequenziamento.

Tali procedure hanno condotto all'identificazione di un frammento genico codificante per l'*Heat shock protein 70* di *Alligator mississippiensis*:

"*Alligator mississippiensis* HSP70 mRNA for heat shock protein 70, complete cds

Sequence ID: [dbj|AB306280.1](#) Expect 3e⁻¹⁵⁶"

```
AGCCCAAGGTGCAGGTGGAGTACAAAGGAGAAACAAAAAGCTTTTATCCAGAGGAAATTTCT
TCCATGGTGCTAACTAAGATGAAGGAAATTGCAGAGGCGTACTTGGGAAAGACTGTTACAAA
TGCTGTCGTCACAGTCCCAGCTTACTTTAATGACTCCCAACGCCAGGCTACAAAAGATGCTG
GAACCATTCAGGTCTCAATGTGCTCCGGATCATCAATGAGCCAACTGCAGCTGCTATTGCT
TATGGCTTGGACAAAAAAGTCGGTGCTGAGAGAAACGTGTTGATCTTCGACCTTGGTGGTGG
CACCTTTGATGTCTCGATCCTCACCATTGAGGATGGCATCTTTGAAGTAAAGTCAACTGCAG
GTGACACCCACTTGGGCGGGGAAGACTTTGACAACAGAATGGTCAACCATTTTCATTGCTGAA
TTCAAGCGCAAACACAAGAAGGACATCAGTGAAAACAAGCGAGCTGTTGAAGGCTCCGCAC
TGCCTGTGAGCGTGCGAAGCGTACTCTCTCCTCCAGCACTCAGGCCAGTATTGAAATAGATT
CCCTGTATGAGGGTATTGACTTCTACACCTCAATTACCAGAGCTCGCTTTGAGGAGCTGAAT
GCTGACTTGTTCCGTGGCACTCTTGACCCAGTGGAGAAAGCCTTGCGGGATGCCAAGCTAGA
TAAATCTCAGTGCATGATATTGTACTTGTTGGTGGCTCCACTCGCATCCCCAAGACCCAGAA
ACTCCTTCGGGATTTCTTCAATGGCAAAGAGCT
```

Primer Forward: AGCCCAAGGTGCAGGTGGAGTA

Primer Reverse: AGCTCTTTGCCATTGAAGAA

7.2.1 Localizzazione di MT-mRNA

Espressione dell'MT durante l'embriogenesi

Nel sistema nervoso di embrioni durante le fasi precoci dello sviluppo l'MT-mRNA è presente nelle cellule della parete delle vescicole nervose (fig. 7.10B) e nelle cellule della parte centrale della retina (fig. 7.10C) che in questa fase non è ancora organizzata in strati. Nelle vescicole pro e mesencefaliche, con la parete ancora sottile ed omogenea (fig. 7.10A), l'MT-mRNA è presente e distribuito in maniera uniforme in tutti i neuroni (fig. 7.10B). Nel midollo allungato (dato non mostrato) e nel midollo spinale (fig. 7.10H) il messaggero è presente in posizione periventricolare, in corrispondenza delle cellule della sostanza grigia che in questa fase si organizza. L'MT-mRNA è assente nei tubuli renali (fig. 7.10I), nel polmone (fig. 7.10M), nella mucosa gastrica (fig. 7.10L) e nel fegato (fig. 7.10L). La localizzazione del messaggero rimane pressoché invariata durante le fasi intermedie dello sviluppo. Nell'encefalo il messaggero è localizzato nella sostanza grigia periventricolare, del telencefalo (dato non mostrato), del diencefalo (fig. 7.10B) e del mesencefalo (fig. 7.10F). In questa vescicola, in particolare, l'MT-mRNA è presente soprattutto in posizione dorso-mediale, nel tetto ottico, nella regione da cui si formerà la corteccia. Nel midollo allungato, il messaggero è presente nella regione periventricolare, ma anche in alcuni nuclei che in questa fase sono in formazione (fig. 7.10G). Nel midollo spinale (fig. 7.10H) l'MT-mRNA è concentrato nella sostanza grigia. Gli organi interni sono negativi all'ibridazione (dati non mostrati). Negli stadi tardivi dello sviluppo, la distribuzione dell'MT-mRNA cambia rispetto agli stadi precedenti. Il primo cambiamento significativo si osserva a livello dell'encefalo: il messaggero non è presente nel telencefalo, nel diencefalo (dati non mostrati) e nel mesencefalo (fig. 7.11B). Nel midollo spinale è presente per la prima volta nella sostanza bianca e nei nuclei delle cellule gliali (fig. 7.11C). Nell'occhio, dove la retina è organizzata in strati (fig. 7.11D,E), l'MT-mRNA è particolarmente concentrato negli strati nucleari e non nello strato gangliare della retina (fig. 7.11E,F). Il messaggero compare per la prima volta nelle cellule del parenchima polmonare (fig. 7.11G), mentre sono negativi all'ibridazione il fegato (fig. 7.11G) e la mucosa intestinale (dato non mostrato). Negli embrioni prossimi alla schiusa, la distribuzione dell'MT-mRNA subisce ancora alcuni cambiamenti. Il messaggero è di nuovo presente a livello delle vescicole encefaliche (fig. 7.11H). Tra gli organi sono positivi per la prima volta la mucosa intestinale (fig. 7.11I,L) e alcune cellule del fegato che per dimensioni e posizione sembrano cellule di Kupffer (fig. 7.11M).

Espressione dell'MT in seguito al trattamento con Cadmio

Le indagini hanno dimostrato che il messaggero della MT è presente nelle vescicole encefaliche (fig. 7.12A-B) e nell'occhio (fig. 7.12C-D) sia di embrioni controllo che trattati con il cadmio senza che si osservino variazioni di rilievo tra la condizione di pre e post-incubazione.

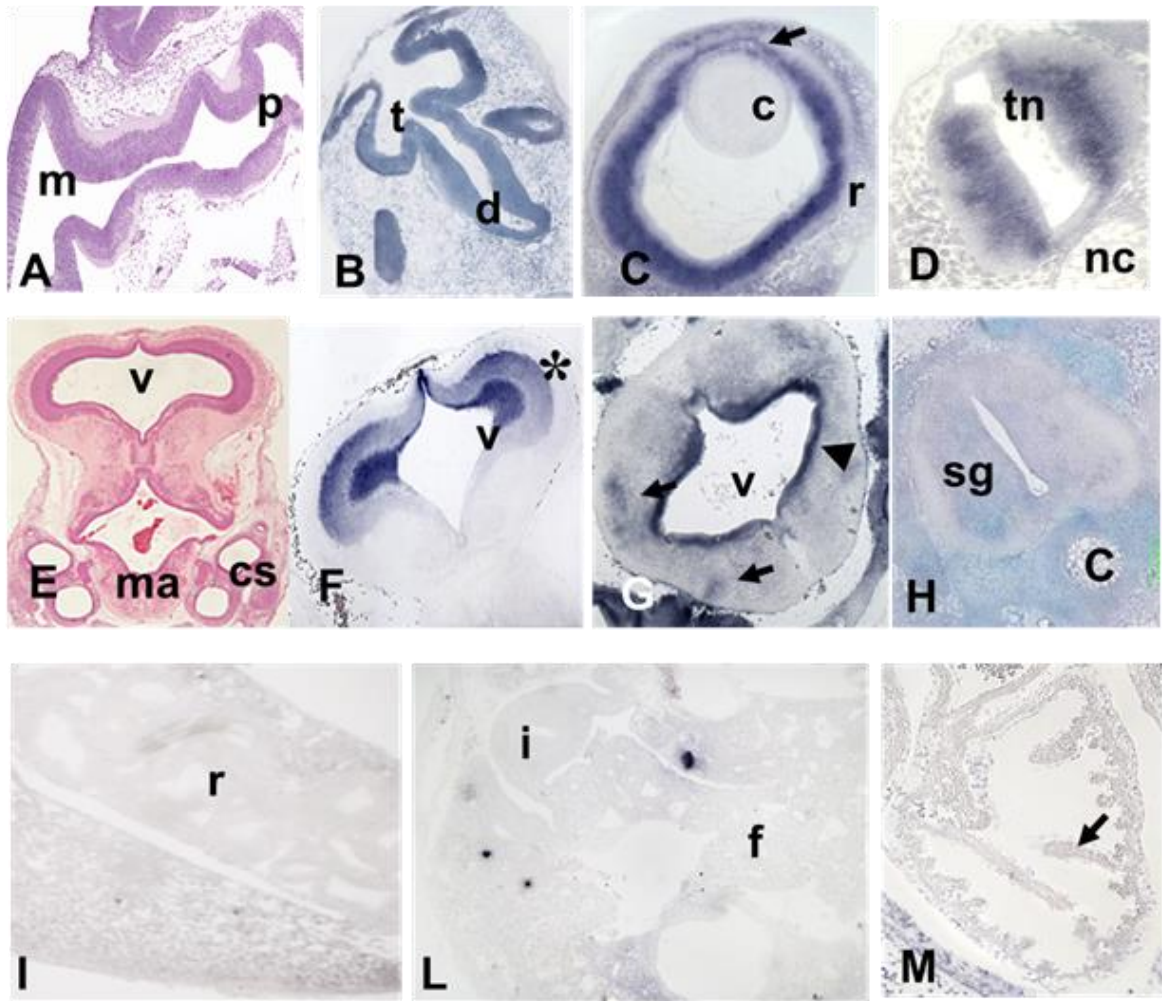


Figura 7.10: Localizzazione dell'MT-mRNA negli stadi precoci e intermedi dello sviluppo. (A) pro (p) e mesencefalo (m) indifferenziati; colorazione con emallume eosina. **(B)** sezione frontale della testa: diencefalo (d) e telencefalo (t) indifferenziati, con marcatura uniforme. **(C)** occhio con retina (r) marcata; il cristallino è marcato nella zona a contatto con l'epidermide da cui si formerà la cornea. **(D)** particolare del tubo neurale marcato (tn) e della notocorda (nc) negativa alla reazione. **(E)** mesencefalo ancora impari, dorsalmente slargato con lobi ottici in formazione. La sostanza grigia dorsale è addossata al ventricolo (v), quella ventrale è organizzata in nuclei sparsi nel corpo. Midollo allungato (ma), canali semicircolari (cs): colorazione con emallume eosina. **(F)** tetto ottico; l'mRNA è presente nella sostanza grigia periventricolare (*). **(G)** midollo allungato; messaggero concentrato nella sostanza grigia (punta di freccia) e, in misura minore, in alcuni nuclei (frecce). **(H)** midollo spinale con messaggero nella sostanza grigia (sg) e nella vertebra (v) in formazione. (c) notocorda negativa. **(I)** rene (r) negativo. **(L)** intestino (i) e fegato (f) negativi. **(M)** polmone con setti (freccia) negativi.

Riprese a : A-B 10x, C-D 20x, E 5x, F-G 10x, H-I 20x, L 10x, M 20x

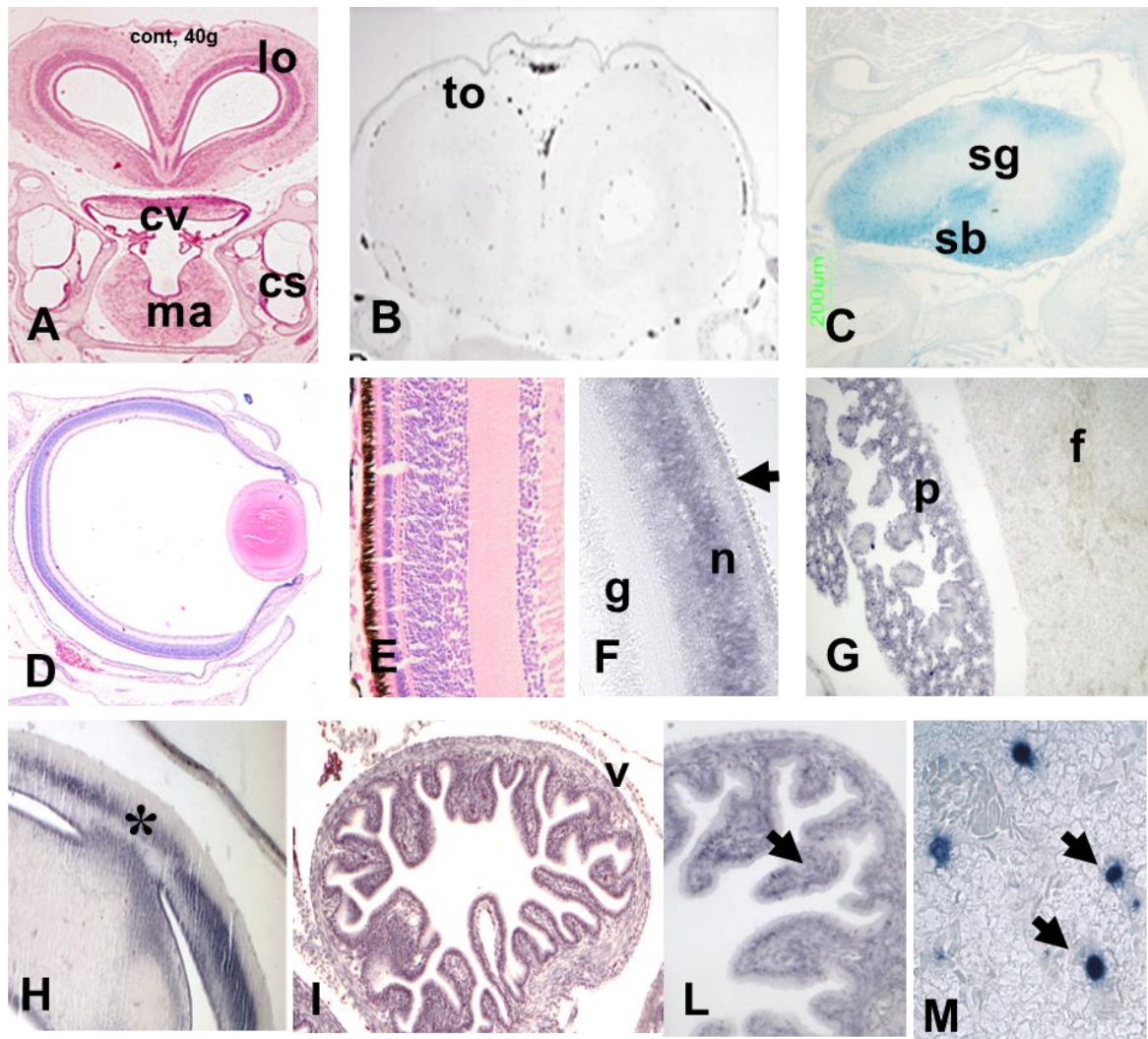


Figura 7.11: Localizzazione dell' MT-mRNA negli stadi tardivi dello sviluppo fino alla schiusa. (A) mesencefalo con lobi ottici (lo) formati, sostanza grigia organizzata in una corteccia. Cervelletto (cv), canali semicirculari (cv); colorazione con emallume eosina. **(B)** mesencefalo con corteccia del tetto ottico (to, *) negativa all'ibridazione. **(C)** midollo spinale con messaggero nella sostanza bianca (sb). Sostanza grigia (sg) negativa. **(D)** occhio con retina completamente stratificata; colorazione con emallume eosina. **(E)** particolare della retina differenziata; colorazione con emallume eosina. **(F)** retina, con strato nucleare interno (n) ed esterno (freccia) positivi, lo strato gangliare (g) è negativo. **(G)** fegato (f) negativo e polmone (p) con parenchima marcato. **(H)** particolare della corteccia (*) e delle cellule ependimali (freccia) positive. **(I)** intestino con villi (v); colorazione con emallume eosina. **(L)** intestino con villi marcati (freccia). **(M)** fegato con alcune cellule di Kupffer marcate (freccie).

Riprese a: A,B,D,I 5x, C,G,H, L 10x, E, F, M 40x,

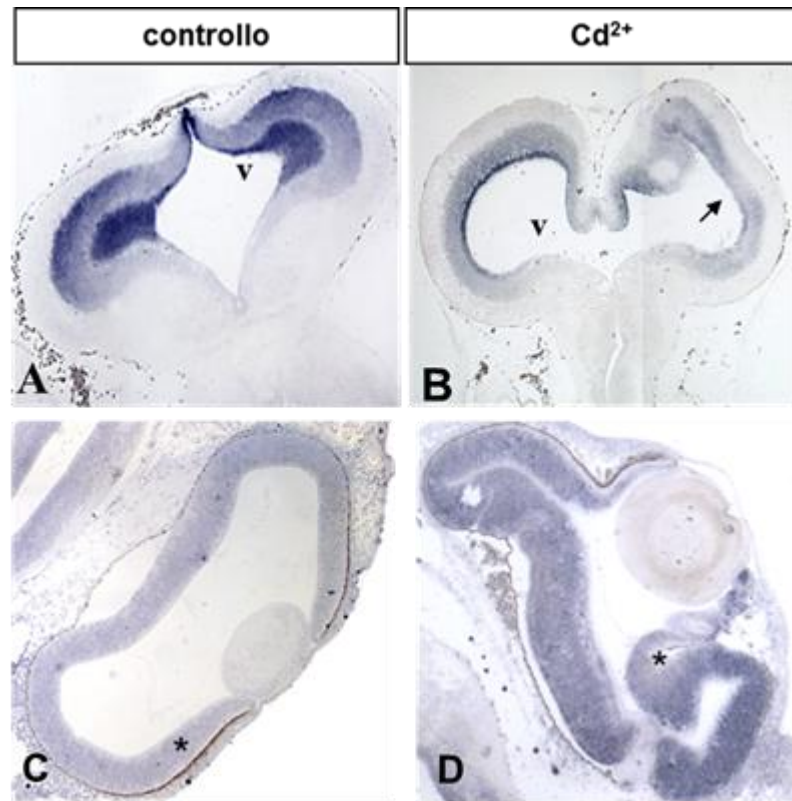


Figura 7.12: localizzazione dell'MT-mRNA nell'encefalo e nell'occhio di embrioni trattati con cadmio. (A) mesencefalo di embrione di controllo: la positività è presente nella regione della corteccia in formazione. **(B)** mesencefalo in embrione trattato: la presenza dell'MT-mRNA si riduce nelle cellule ependimali del lobo alterato (freccia). **(C)** in embrione di controllo : la retina presenta marcatura omogenea (*). **(F)** occhio alterato di embrioni trattato con Cd²⁺. La marcatura è presente in tutta la retina, anche nelle pliche (*).

Ripresa a: A, B, C, D 5x.

7.2.2 Localizzazione di HSP70-mRNA

Espressione dell'HSP durante l'embriogenesi

Durante gli stadi precoci dello sviluppo, l'HSP70-mRNA non è presente a livello del sistema nervoso: le vescicole encefaliche sono negative alla reazione (fig. 7.13A). Il midollo spinale (fig. 7.13B) e l'occhio (fig. 7.13C) sono negativi. Negli organi, non si osserva la presenza dell'HSP70-mRNA: il polmone (dato non mostrato), il rene (fig. 7.13D,G), l'intestino (fig. 7.13D,E) e il fegato sono negativi (fig. 7.13D,F). Negli embrioni, intorno ai 20 giorni di sviluppo, la presenza e la distribuzione dell'HSP70-mRNA mostrano significativi cambiamenti. Il messaggero è presente nella sostanza grigia periventricolare del telencefalo, diencefalo e mesencefalo (fig. 7.14A-C). Una significativa positività è presente nel midollo allungato (dato non mostrato) e nel midollo spinale (fig. 7.14E). Non si rileva la presenza del messaggero nel rene (fig. 7.14F), nel polmone (fig. 7.13F,G), nell'intestino (dato non mostrato) e nel parenchima epatico (fig. 7.14F). In stadi più avanzati dello sviluppo fino alla schiusa, non si osservano cambiamenti significativi nella distribuzione del messaggero. L'HSP70-mRNA è presente nelle vescicole nervose (dati non mostrati) e negli strati nucleari della retina ormai differenziata (fig. 7.14H), manca negli organi interni (fig. 7.14I,L).

Espressione dell'HSP in seguito al trattamento a freddo

Le indagini hanno dimostrato che il messaggero della HSP è presente nelle vescicole encefaliche (fig. 7.15A-F) e nell'occhio (fig. 7.15G-H) sia di embrioni controllo che trattati a freddo senza che si osservino variazioni di rilievo tra la condizione di pre e post-incubazione.

Per quanto riguarda gli organi interni, l'analisi *in situ* ha dimostrato la presenza di marcatura in corrispondenza di cellule del fegato sparse tra i cordoni (fig. 7.16B), in embrioni trattati a freddo. Nel rene di questi ultimi (fig. 7.16D), invece, non si osservano alterazioni relative alla localizzazione del trascritto rispetto alla condizione di controllo (fig. 7.16C).

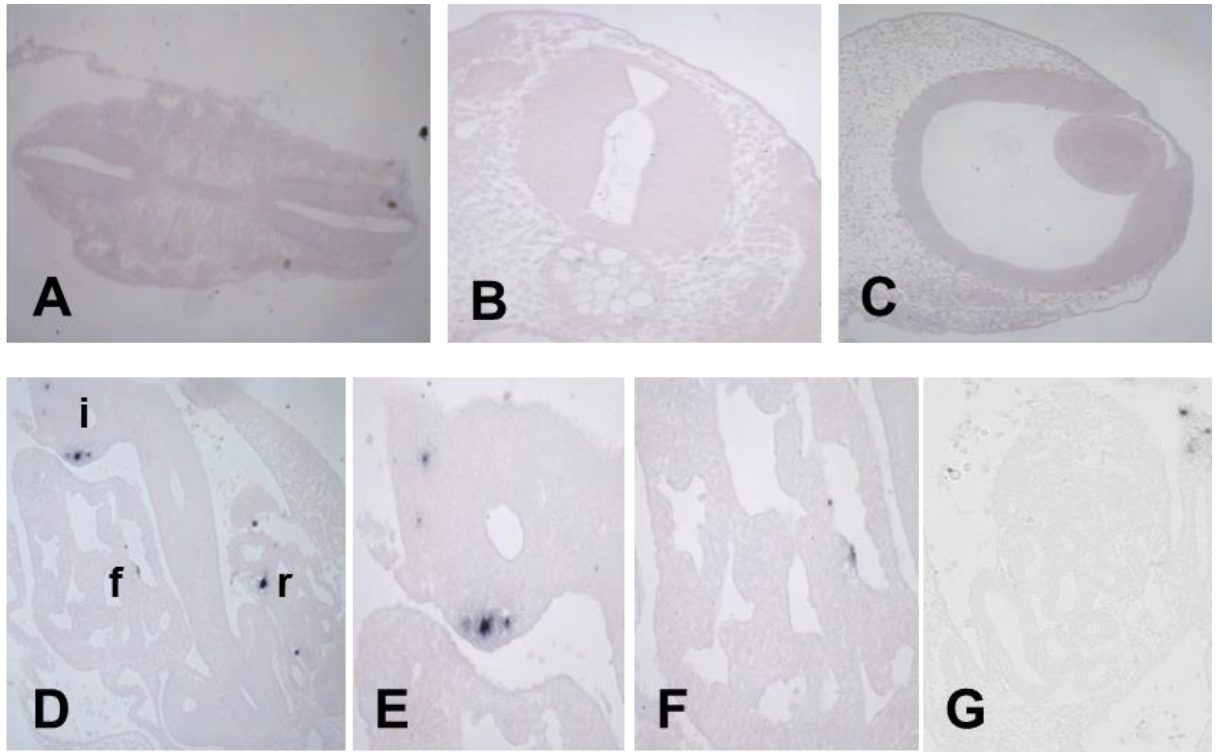


Figura 7.13: Localizzazione dell'HSP70-mRNA negli stadi precoci dello sviluppo.

(A) tubo neurale. **(B)** midollo spinale, non marcato, con vertebra in formazione. **(C)** occhio con retina, non marcato. **(D)** fegato (f), intestino (i), rene (r). **(E)** intestino, non marcato. **(F)** fegato, non marcato. **(G)** rene, non marcato.

Riprese a: A-D 5x, E-G 10x

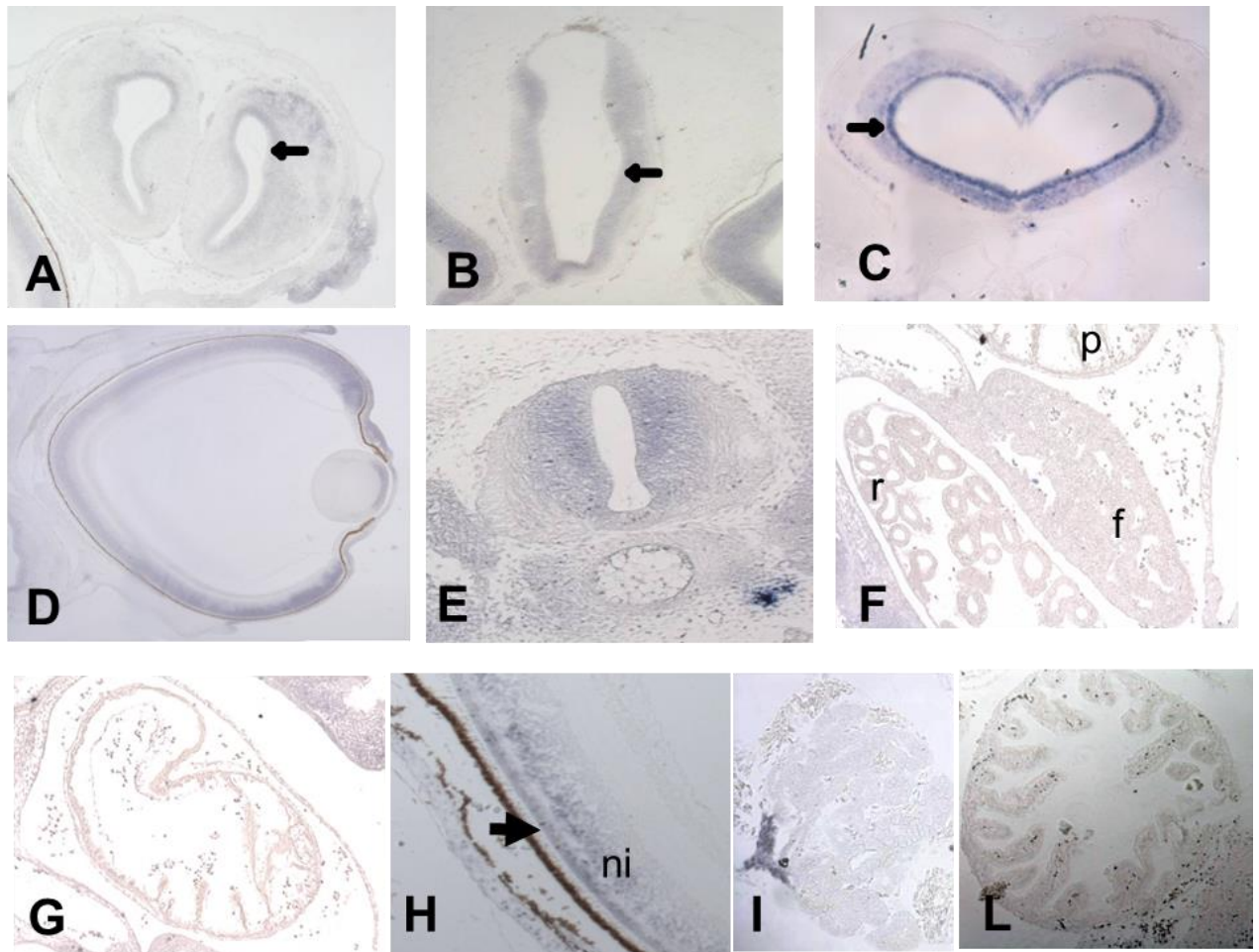


Figura 7.14: Localizzazione dell'HSP70-mRNA negli stadi itermedi (A-G) fino alla schiusa (H-L). (A) telencefalo: sostanza grigia periventricolare marcata (freccia). (B) diencefalo: sostanza grigia periventricolare marcata (freccia). (C) mesencefalo: sostanza grigia periventricolare marcata (freccia). (D) occhio marcato. (E) midollo spinale con sostanza grigia marcata. (F) rene, fegato, polmone, non marcati. (G) polmone non marcato. (H) retina differenziata con strato nucleare esterno (freccia) ed interno (ni) positivi all'ibridazione. embrione. (I) rene ed (L) intestino negativi.

Riprese a : A-D, F 5x, E,G,I,L 10x, H 20x

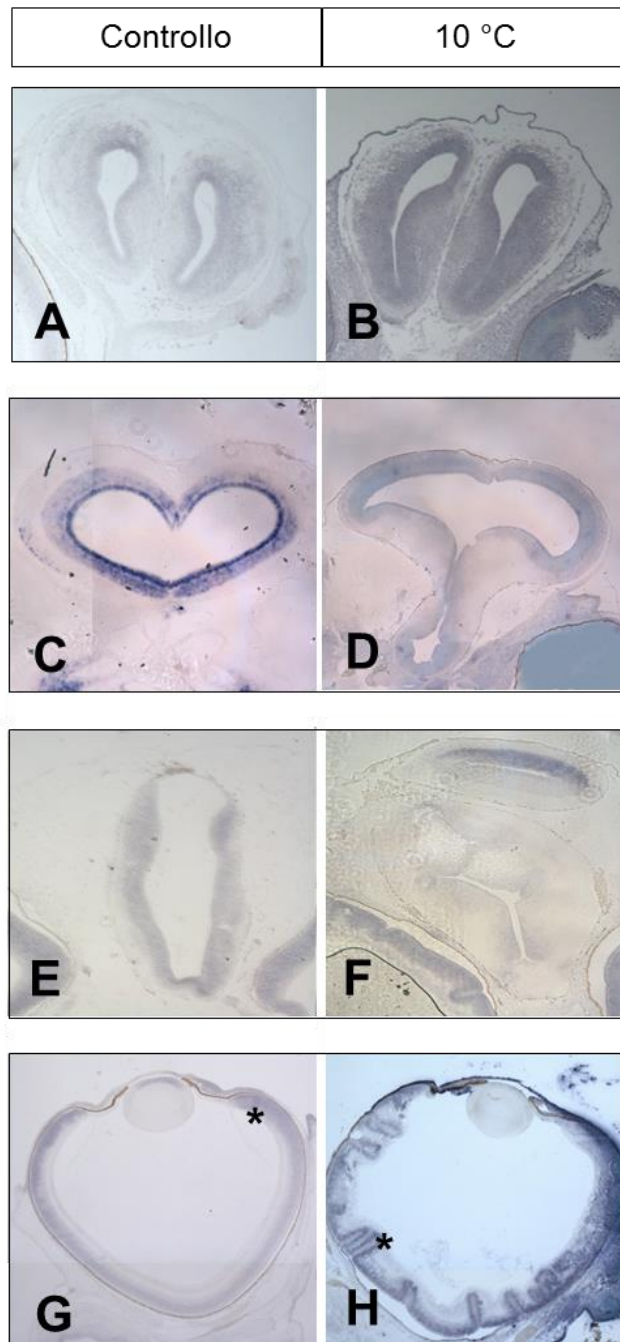


Figura 7.15: Localizzazione dell'HSPs-mRNA nell'encefalo e nell'occhio di embrioni incubati a 10°C.

(A) Telencefalo di embrione di controllo: la positività è presente nella sostanza grigia periventricolare. **(B)** Telencefalo in embrione incubato 10 °C: si nota la presenza del messaggero nella sostanza grigia e anche nella bianca. **(C)** Tetto ottico in embrione di controllo: la positività è presente nella regione periventricolare. **(D)** Tetto ottico in embrione incubato a 10 °C: la positività è presente nella regione periventricolare. **(E)** Diencefalo in embrione di controllo: la positività è presente nella regione periferica. **(F)** Diencefalo in embrione incubato a 10 °C: la marcatura è presente nella regione endimale; si nota anche parte del tetto ottico che presenta positività. **(G)** Occhio in embrione di controllo: la retina presenta marcatura (*) negli strati cellulari **(H)** Occhio alterato di embrione incubato a 10 °C: la marcatura è presente in tutta la retina, anche nelle pieghe (*).

Ripresa a: A-H: 5x.

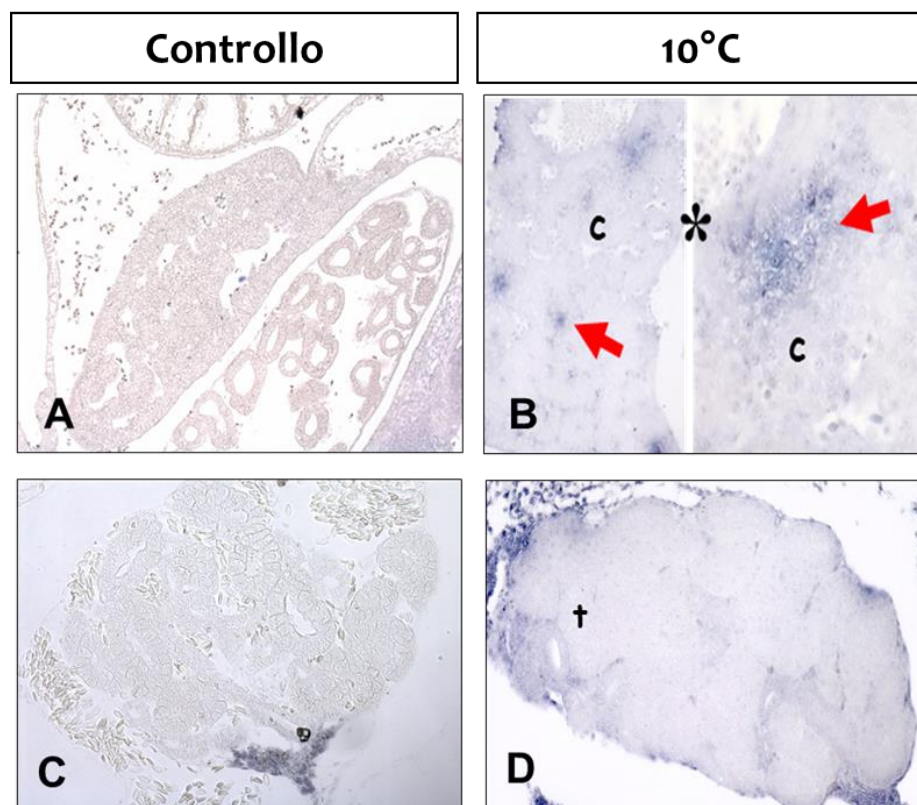








Figura 7.16: Localizzazione dell'HSP70mRNA nel fegato e nel rene di embrioni trattati a 10°C

A) Fegato: si nota l'assenza della marcatura. **B)** fegato: si nota una significativa marcatura su piccoli gruppi di cellule sparse tra i cordoni. A destra: dettaglio di un gruppo di cellule marcate (freccia). Cordoni negativi (c). **C)** Rene: la marcatura è assente. **D)** rene: assenza di marcatura sui tubuli (t).

Capitolo 8

Discussioni

-  Teratogenesi Sperimentale
-  Evidenze morfologiche in *Danio rerio*
-  Evidenze morfologiche in *Podarcis sicula*
-  Evidenze molecolari in *Danio rerio*
 - Azione del cadmio sull'espressione genica
 - Azione del freddo sull'espressione genica
 - Localizzazione molecolare *in situ*
-  Evidenze molecolari in *Podarcis sicula*
 - Azione del cadmio sull'espressione genica
 - Azione del freddo sull'espressione genica
 - Localizzazione molecolare *in situ*
-  Conclusioni

8 Teratogenesi Sperimentale

La moderna teratologia dello sviluppo si avvale di un approccio multidisciplinare: partendo da evidenze morfologiche, attraverso l'analisi dell'espressione genica e delle proteine, viene studiata l'intera patogenesi della malformazione embrionale.

In questo lavoro di tesi si è cercato di definire il profilo molecolare dei geni associati alle alterazioni morfologiche indotte da stress durante lo sviluppo embrionale di Vertebrati non Mammiferi. A tale scopo è stato condotto uno studio comparato tra due sistemi biologici: l'Ittiopside *Danio rerio* e il Tetrapode oviparo *Podarcis sicula*. Questi organismi sono collegati da un punto di vista filogenetico, quindi è plausibile che utilizzino le stesse vie metaboliche e gli stessi *pathway* molecolari per espletare le medesime funzioni cellulari; al contempo essendo un organismo acquatico l'uno e terrestre l'altro è implicito che abbiano evoluto differenti meccanismi adattativi, atti alla sopravvivenza ed alla riproduzione.

Nel corso degli esperimenti, gli embrioni di entrambi gli organismi sono stati sottoposti a due tipi di stress: uno shock termico (repentino abbassamento della temperatura), ed uno chimico, (esposizione al cadmio).

In particolare, lo scopo principale di questo lavoro sperimentale è stato quello di:

- Verificare se lo stesso tipo di stress, sia esso chimico (il cadmio) o fisico (il freddo), induce lo stesso tipo di alterazioni, sia morfologiche che molecolari, in due diversi organismi, *Danio rerio* e *Podarcis sicula*.
- Verificare se diversi tipi di stress, il cadmio e il freddo, inducono le stesse alterazioni, sia morfologiche che molecolari, nel medesimo organismo (*Danio rerio* o *Podarcis sicula*).

8.1 Evidenze morfologiche in *Danio rerio*

In questo lavoro sono stati condotti esperimenti su embrioni di *Danio rerio* nelle prime fasi di sviluppo, corrispondenti alle fasi di segmentazione e gastrulazione precoce (4-8 hpf), periodo nel quale i territori presuntivi dell'embrione non si sono ancora sistemati definitivamente, ciò rende difficile visualizzare evidenti anomalie dello sviluppo esclusivamente sul piano morfologico.

Pertanto è risultato impossibile effettuare una discriminazione "macroscopica" tra gli embrioni tenuti in condizioni fisiologiche e quelli invece sottoposti a trattamento. Infatti per entrambi gli stimoli stressori - cadmio e freddo - l'unica informazione proveniente

dai trattamenti effettuati, basata sulla semplice osservazione degli embrioni, riguarda soprattutto eventi di *embriomortalità-stress-indotta* piuttosto che di *embriotossicità*. Confrontando gli embrioni controllo e i trattati, in fasi così precoci dello sviluppo, si è riscontrato infatti un aumento del tasso di mortalità embrionale. Soltanto per quanto riguarda lo studio dello stress da basse temperature (10°C), è stato dimostrato un prevedibile rallentamento dello sviluppo degli embrioni tenuti a freddo, rispetto ai controlli. Per quel che riguarda, invece, gli embrioni in fase di sviluppo medio-avanzata (durante la somitogenesi, 24-48 hpf) dalla letteratura è noto che concentrazioni subletali (100µM) di cadmio inibiscono un corretto sviluppo del sistema nervoso causando fenotipi riconducibili soprattutto ad ipoplasie del capo e degli occhi (Chow, Hui et al. 2008).

8.2 Evidenze Morfologiche in *Podarcis sicula*

I risultati delle analisi citologiche in microscopia ottica hanno dimostrato che per quel che concerne le fasi precoci dello sviluppo di *Podarcis sicula* (5+5), i trattamenti a cui sono stati sottoposti gli embrioni indicano che le basse temperature (10°C), a differenza del cadmio, inducono letalità e non embriotossicità per quasi tutti gli embrioni analizzati. Per quanto riguarda, invece, le fasi di sviluppo più tardive i due diversi fattori di stress, il cadmio ed il freddo, pur non provocando la morte degli embrioni, il cui sviluppo continua anche durante la fase di stress, inducono alterazioni morfologiche simili a carico delle vescicole encefaliche e degli occhi in via di sviluppo. Questi risultati sono in accordo con studi recenti che hanno infatti dimostrato che la presenza di un guscio membranoso di cui sono dotate le uova di alcuni rettili come *Podarcis* non protegge completamente l'embrione dai diversi contaminanti ambientali e da fattori di stress (Harris 1998). Per quanto riguarda invece i danni provocati dal repentino abbassamento della temperatura a cui sono stati sottoposti gli embrioni in via di sviluppo, bisogna tener presente che questi animali sono eterotermi, quindi non posseggono meccanismi metabolici che possano bilanciare le variazioni di temperatura dell'ambiente esterno. Molto probabilmente, anche bruschi innalzamenti della temperatura possono pregiudicare il corretto sviluppo dei tessuti embrionali. In ogni caso, la presenza di alterazioni morfologiche a carico del sistema nervoso, in particolare delle vescicole encefaliche e dell'occhio, simili sia per i trattamenti con il cadmio che con il freddo, dimostra che queste strutture sono sensibili all'effetto di stimoli stressori di

diversa natura, chimica e fisica. Anche nei mammiferi è stato dimostrato che le cellule della matrice del cervello in via di sviluppo sono particolarmente sensibili all'azione di vari agenti teratogeni, e che tale sensibilità aumenta quando le cellule ventricolari indifferenziate iniziano a differenziarsi in neuroni cerebrali corticali (Kameyama and Nagasaka 1983).

8.3 Evidenze molecolari in *Danio rerio*

Gli esperimenti condotti nel corso di questa ricerca confermano una chiara alterazione dell'espressione genica negli embrioni sottoposti a trattamento sia con cadmio che a freddo, evidenziando principalmente che le alterazioni coinvolgono lo sviluppo del sistema nervoso, l'integrità delle membrane cellulari e i meccanismi di regolazione genica. Il numero di trascritti differenzialmente espressi in condizioni di stress, messi in evidenza con le analisi di mRNA *Differential Display*, è stato di 8, dei quali 3 sono *up-regulated* (attivati) e 5 *down-regulated* (inibiti).

○ 8.3.1 Azione del cadmio sull'espressione genica

Analizzando le caratteristiche dei trascritti up-regolati a seguito del trattamento con CdCl_2 alla concentrazione finale di 100 μM , appare evidente che le alterazioni indotte da Cd coinvolgono meccanismi molecolari fondamentali, come quelli alla base dell'integrità delle membrane cellulari (il trascritto *Cryl1*), la proliferazione cellulare e lo sviluppo (*Rbbp6*), la regolazione trascrizionale (*Zfx*).

- Trascritto 2A4: *Cryl1* (*Danio rerio* *Crystallin lambda 1*)

Cryl1 è un gene altamente conservato, che ha una controparte ortologa in vari organismi, uomo compreso. Esso codifica per l'enzima 3-idrossiacil-CoA deidrogenasi, la cui attività viene espletata durante il metabolismo degli acidi grassi. Queste molecole rivestono un'importanza fondamentale per il benessere dell'organismo, in quanto implicate in diversi processi biologici essenziali quali lo sviluppo, la produzione di energia, l'integrità della membrana cellulare e mitocondriale in quanto costituenti dei fosfolipidi, la sintesi dell'emoglobina; gli acidi grassi sono anche i precursori degli eicosanoidi, importanti mediatori chimici a livello cellulare.

Il deficit dell'idrossiacil-CoA deidrogenasi durante lo sviluppo embrionale, rilevato nell'uomo grazie allo screening neonatale, è una patologia mitocondriale di β -

ossidazione degli acidi grassi e provoca cardiomiopatie, anche fatali, quali cardiomegalia, ipertrofia ventricolare sinistra, e scarsa contrattilità. In altri casi si manifestano disturbi di differente natura, come ipoglicemia non chetotica, rigurgito, ipotonia ed epatomegalia, tutti riconducibili al deficit dell'idrossiacil-CoA deidrogenasi (Nada, Vianey-Saban et al. 1996; Cox, Soury et al. 1998).

- Trascritto 2A4: *Rbbp6* (*Danio rerio retinoblastoma binding protein 6*)

Il gene *Rbbp6* codifica per una proteina che sembra essere conservata in tutti i vertebrati, ma assente in procarioti e invertebrati. Una delle principali funzioni della proteina *Rbbp6* è quella di legare la proteina del Retinoblastoma (Rb) in forma non fosforilata. Rb è un oncosoppressore che svolge la fondamentale funzione di prevenire la crescita eccessiva delle cellule, inibendo la progressione del ciclo cellulare.

Rbbp6, nell'uomo, interagisce anche con la proteina p53, ed è stata classificata come una E3ubiquitina ligasi per la presenza di un dominio N-terminale estremamente conservato in tutti i vertebrati definito "DWNN domain" [Domain With No Name] (Chibi, Meyer et al. 2008; Kappo, Ab et al. 2012), promuove l'ubiquitinazione del fattore di trascrizione YBX1, indirizzandolo verso la via di degradazione mediata dal proteosoma. *Rbbp6*, quindi, al contrario della proteina Rb, incrementa la proliferazione cellulare poiché promuove la degradazione dell'oncosoppressore p53.

Rbbp6 risulta essere una proteina estremamente versatile, in quanto funge anche da *scaffold* per promuovere l'assemblamento del complesso p53/TP53-MDM2, in modo da permettere l'ubiquitinazione (MDM2 dipendente) del complesso p53/TP53.

In *Danio rerio*, questo trascritto è stato individuato quale uno dei geni essenziali per lo sviluppo precoce di questo teleosteo (Amsterdam, Nissen et al. 2004).

- Trascritto 2G3: *Zfx* (*Danio rerio zinc finger protein, X-linked*)

Questo gene codifica per una proteina legata al cromosoma X, recante un dominio *zinc-finger* caratteristico delle proteine che si legano al DNA. Tale dominio è presente nei regolatori trascrizionali che controllano la struttura della cromatina, ed è essenziale nella trascrizione di diverse proteine, comprese quelle appartenenti alla famiglia dell'oncogene BCL-6 (Huynh and Bardwell 1998) e quelle coinvolte in processi legati allo sviluppo embrionale, quali metamorfosi, sviluppo neuronale e differenziamento delle cellule della regione ottica in *Drosophila* (Wen, Perissi et al. 2000). In *Danio rerio* sono state identificate delle forme di *Zfx* tessuto-specifiche, ritrovate a livello degli occhi,

dei reni, del cuore e del tessuto ovarico. Inoltre, durante lo sviluppo embrionale l'espressione di *Zfx* risulta essere stadio-specifica, con diverse isoforme evidenziabili tra stadio di gastrula e quello di scudo embrionale.

○ 8.3.2 Azione del freddo sull'espressione genica

L'incubazione degli embrioni ad una temperatura nettamente inferiore a quella fisiologica per questa specie (10°C contro 28°C), provoca l'inibizione dell'espressione di 5 trascritti. Di seguito sono riportate le caratteristiche dei geni, e quindi dei prodotti proteici, corrispondenti a questi trascritti.

Trascritto 1G10b: *Rbm 38* (*Danio rerio* RNA binding motif protein 38)

Questo trascritto corrisponde ad un gene codificante una proteina legante l'RNA, che nell'uomo è coinvolta in una serie di processi importanti di segnalazione cellulare, come la stabilizzazione dei messaggeri mediante legame alla 3'-UTR di questi ultimi, la risposta ai danni a carico del DNA, il differenziamento cellulare, o ancora lo splicing dell'RNA ed il processamento dei trascritti intracellulari. In particolare questa RNA binding protein nell'uomo interagisce con la 3'-UTR del trascritto p21, un inibitore di una chinasi ciclina-dipendente, con il risultato di stabilizzarlo inducendo così l'arresto del ciclo cellulare (Shu, Yan et al. 2006).

Trascritto 1G10c: *Cyyr1* (cysteine and tyrosine-rich protein 1)

Il gene *Cyyr1* è costituito da 4 piccoli esoni e 3 introni. Il locus è multi-trascritto, e a tutt'oggi sono state identificate 5 isoforme oltre a quella principale di riferimento (tutte prodotte da fenomeni splicing alternativo), oltre a un trascritto antisenso embricato al gene (Vitale, Casadei et al. 2002).

Cyyr1 appartiene a una famiglia genica tipica solo dei vertebrati, nei quali è molto conservata. La proteina è caratterizzata da tre domini, uno centrale ricco di tirosine e cisteine (CCSYAY), tre motivi PPPY all'estremità C-terminale e un dominio transmembrana all'estremità N-terminale. Gli esperimenti di localizzazione cellulare indicano che in *D. rerio* questa proteina si trova a livello della membrana plasmatica, grazie ai domini PPPY dell'estremità C-terminale che permettono l'interazione tra membrana plasmatica e citoscheletro (ZFIN). È importante sottolineare che in seguito alla perdita di questo tipo di interazione si riscontrano alterazioni durante lo sviluppo

embrionale, in particolare a carico dei meccanismi di adesione, migrazione, proliferazione e differenziamento cellulare.

Trascritto 1G11Lb: (*Danio rerio beta-synuclein mRNA*)

Nell'uomo la famiglia delle sinucleine è costituita da tre proteine, α -sinucleina, β -sinucleina, γ -sinucleina, con una lunghezza variabile dai 127 ai 140 aminoacidi, caratterizzate da una identità di sequenza del 55-62% e da una simile organizzazione in domini.

Le 3 sinucleine si trovano comunemente associate alla membrana. Tra queste proteine la più studiata è la α -sinucleina, in quanto coinvolta in molti aspetti dello sviluppo, della funzionalità e della degenerazione del sistema nervoso centrale: gioca infatti un ruolo principale nella patogenesi del morbo di Parkinson e in altri disordini neurodegenerativi (sinucleopatie). L' α -sinucleina è espressa nel sistema nervoso centrale, dove regola la mobilitazione delle vescicole pre-sinaptiche. Le proprietà delle altre 2 sinucleine, beta e gamma, sono diverse, sebbene strutturalmente tutte e tre le proteine siano simili, tanto che si suppone agiscano con effetti sinergici durante la neurogenesi. La β -sinucleina è localizzata principalmente a livello encefalico, probabilmente agisce come inibitore dell'aggregazione dell' α -sinucleina (Noori-Daloui, Kheirollahi et al. 2010); tale aggregazione, che a sua volta favorisce l'aggregazione delle vescicole pre-sinaptiche, è facilmente riscontrabile in malattie quali il morbo di Parkinson, l'Alzheimer e la sindrome di Down (Narayanan and Scarlata 2001; Hashimoto, Bar-On et al. 2004). Questo ruolo inibitorio suggerisce che la β -sinucleina possa essere un fattore "anti-Parkinson".

Trascritto 1A6a: ALDH-A1(*Danio rerio aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1a*)

La proteina ALDH-A1 appartiene alla famiglia delle aldeidi deidrogenasi. Questo enzima è una deidrogenasi NAD-dipendente localizzata nella matrice mitocondriale, e catalizza la seconda fase del processo di degradazione della prolina, convertendo la pirrolina-5-carbossilato in glutammato. La carenza di questo enzima è associata all'iperprolinemia di tipo II, una malattia autosomica recessiva caratterizzata da accumulo di delta-1-pirrolina-5-carbossilato (P5C) e prolina.

In generale, la superfamiglia delle aldeidi deidrogenasi (ALDH) rappresenta un gruppo di enzimi che catalizza la conversione dei vari tipi di aldeidi alifatiche e aromatiche nei corrispondenti acidi carbossilici, attraverso una reazione NAD(P)+-dipendente

essenzialmente irreversibile (Yoshida, Kong et al. 1998). Le ALDH sono considerate degli enzimi detossificanti che eliminano aldeidi esogene ed endogene. Queste ultime sono prodotte durante la sintesi dell'acido retinoico (Vasiliou and Pappa 2000) e dal metabolismo di amminoacidi, alcool, vitamine, steroidi e lipidi. La presenza di geni codificanti per le ALDH nella maggior parte delle specie di Archea, Eucarioti ed Eubatteri avvalora l'ipotesi che questi enzimi siano coinvolti in importanti processi metabolici, e che questa superfamiglia derivi da eventi di duplicazione di un gene ancestrale.

La superfamiglia delle ALDH comprende enzimi che hanno proprietà catalitiche, ed enzimi che legano proteine e interagiscono con sostanze endogene ed esogene di natura diversa. Le varie ALDH umane sono state distinte sulla base delle proprietà chimico-fisiche, enzimatiche, della localizzazione subcellulare e distribuzione tessuto-specifica (Yoshida, Kong et al. 1998). Il genoma umano contiene almeno 17 geni che sono membri della superfamiglia delle ALDH.

Trascritto 1C8Lb: COX1 (*Danio rerio cytochrome c oxidase subunit 1*)

La sequenza identificata codifica per un enzima, la subunità 1 della citocromo C ossidasi, che svolge un ruolo importante nel ciclo di Krebs, un ciclo metabolico di fondamentale importanza in tutte le cellule che utilizzano ossigeno nel processo di respirazione cellulare. Negli organismi aerobici, infatti, il ciclo di Krebs rappresenta l'anello di congiunzione delle vie metaboliche responsabili della degradazione (catabolismo) dei carboidrati, dei grassi e delle proteine in anidride carbonica e acqua, con la produzione di energia chimica. Inoltre, il ciclo fornisce anche molti precursori per la produzione di alcuni aminoacidi (ad esempio l' α -chetoglutarato e l'ossalacetato).

E' da notare che tutti i trascritti differenzialmente espressi fanno riferimento a fenomeni di *spegnimento* dell'espressione genica. Pertanto è possibile dedurre che il rallentamento dell'embriogenesi di *Danio rerio*, osservato in seguito al trattamento a freddo, sia direttamente relazionato all'inibizione di alcuni enzimi implicati nel metabolismo e nella fisiologia cellulare che risulterebbero quindi fondamentali per la sopravvivenza cellulare, nonché per lo sviluppo.

○ **8.3.3 Localizzazione molecolare *in situ***

Al fine di valutare l'espressione di geni connessi allo stress e all'embriogenesi è stata analizzata la localizzazione di due geni quali Rbbp6, coinvolto nella proliferazione

cellulare, e Cryl1 che codifica per l'enzima 3-idrossiacil-CoA deidrogenasi coinvolta principalmente nel metabolismo degli acidi grassi. Il cadmio, infatti, è in grado di alterare la trascrizione e l'espressione intercalandosi tra i filamenti di DNA, e sostituendo lo zinco nell'acido desossiribonucleico, destabilizzandone la struttura ad elica (Stohs, Bagchi et al. 2000). I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'espressione di questi geni è alterata, in particolare si riscontra un'up-regolazione negli esemplari trattati con Cadmio. Rbbp6, gioca un ruolo chiave nel controllo della divisione cellulare e nel differenziamento cellulare, la sua up-regolazione è in linea con le informazioni in nostro possesso, che ci mostrano come sulla retina ci sia un aumento dei processi apoptotici e di rigenerazione (dati non mostrati), in seguito all'esposizione al cadmio. In *Danio rerio*, questo trascritto è stato individuato quale uno dei geni essenziali per lo sviluppo precoce di questo teleosteo (Amsterdam, Nissen et al. 2004). I risultati ci mostrano come il gene Rbbp6, negli esemplari controllo e in quelli trattati con dosi ambientali di cadmio, non subisca nessun cambiamento nell'espressione. Al contrario, esso è up-regolato in seguito a trattamento acuto con cadmio. In questo caso le cellule in seguito all'up-regolazione di Rbbp6 andrebbero incontro ad una proliferazione cellulare maggiore rispetto al normale, ciò, unita all'azione mutagenica del cadmio potrebbe causare l'eventuale perpetrarsi di aberrazioni geniche che sfuggono al normale controllo e quindi causare, l'istaurarsi di situazioni patologiche, anche gravi, come una neoplasia della retina.

Per quanto riguarda Cryl1, esso è un gene altamente conservato, che ha una controparte ortologa in vari organismi, uomo compreso. Esso codifica per l'enzima 3-idrossiacil-CoA deidrogenasi, la cui attività viene espletata durante il metabolismo degli acidi grassi. Come abbiamo specificato precedentemente, queste molecole rivestono un'importanza fondamentale per il benessere dell'organismo, in quanto implicate in diversi processi biologici essenziali quali lo sviluppo. Inoltre l'importanza di questi geni è stata connessa a fenomeni di risposta allo stress, ed infatti i loro prodotti proteici sono anche definiti "*stress-crystallins and enzyme-crystallins*". (de Jong, Hendriks et al. 1989). Anche in questo caso, gli esemplari trattati con dosi ambientali di cadmio (<3 microM) non presentano marcatura sull'intera retina. Nella retina di *Danio* esposti a 20 microM di cadmio, invece, è up-regolato, si nota, infatti, la presenza di marcatura in entrambi gli strati nucleari (interno ed esterno), sui nuclei delle cellule bipolari, dei bastoncelli e sul citoplasma dei coni e nello strato delle cellule gangliari, situazione analoga si osserva anche negli esemplari *Danio rerio* esposti a trattamento acuto con 40 microM di cadmio.

L'up-regolazione di Cryl1 riscontrata in questi esemplari, potrebbe essere correlata all'azione del cadmio, essendo in grado di aumentare la formazione di radicali liberi in seguito alla sua esposizione. L'aumento dei ROS nelle cellule, infatti, costituisce una fonte di potenziali danni se le loro concentrazioni superano quelle delle difese anti ossidanti, in quanto essi sono in grado di indurre trasversioni nell'elica di DNA e perossidazione lipidica, in tutti i distretti cellulari, anche se in maggior misura al livello dei mitocondri essendone i maggiori produttori (Gabor 1978). L'up-regolazione di Cryl1 nei trattati a 20 microM e 40 microM di cadmio, potrebbe essere letta come una risposta delle cellule, infatti, per ridurre le concentrazioni di radicali liberi interviene il glutatione, l'antiossidante per eccellenza, esso si ossida a GSSG riducendo i radicali liberi e a sua volta ritorna nello stato ridotto (GSH) grazie al NADPH prodotto dallo shut dei pentoso fosfati. Quando le cellule si trovano in uno stato di stress ossidativo, come in questo caso, le concentrazioni di GSH crollano mentre aumentano quelle del GSSH, le cellule nel tentativo di ripristinare i livelli di glutatione ridotto, attingono alle riserve di NADPH che a sua volta diminuirà innescando una reazione a catena, in quanto più glucosio sarà utilizzato per la via dei pentosi fosfati anziché per la glicolisi, ciò si esplica in una progressiva deplezione di ATP. Quindi nel tentativo di difendersi dai danni indotti da ROS aumenterebbe anche l'espressione dell'enzima 3-idrossiacil-CoA deidrogenasi, per garantire l'integrità di membrana e ristabilire il metabolismo basale.

8.4 Evidenze molecolari in *Podarcis sicula*

○ 8.4.1 Azione del Cadmio sull'espressione genica

Dati bibliografici recenti dimostrano che dal punto di vista molecolare, in embrioni di *Podarcis* trattati con cadmio (Trinchella, Cannetiello et al. 2010), si osserva un'alterazione dell'espressione di trascritti inerenti la membrana plasmatica e la regolazione dell'espressione genica. Gli effetti teratogeni del cadmio sembrano manifestarsi direttamente, modificando l'equilibrio elettrochimico della membrana e agendo su fattori trascrizionali correlati a geni strettamente legati allo sviluppo embrionale, ed indirettamente, causando una serie di meccanismi a catena che regolano attività cellulari e geni fondamentali dell'embriogenesi.

○ 8.4.2 Azione del freddo sull'espressione genica

Nel presente lavoro di tesi, le analisi di DDRT-PCR hanno portato all'identificazione di un gene down-regolato, e quindi differenzialmente espresso, in seguito all'incubazione degli embrioni alla temperatura di 10 °C. Il gene in questione codifica per la proteina SUV4-20H1 (*SUppressor of Variegation 4-20 Homolog 1*), una metiltransferasi responsabile della metilazione della lisina in posizione 20 nell'istone H4 (Yang, Pesavento et al. 2008). L'attività metiltrasferasica svolge un ruolo importante nel controllo della proliferazione cellulare, nello sviluppo, nell'oncogenesi, nel silenziamento telomerico e centromerico ed anche nella definizione dell'architettura dei cromosomi. Numerosi risultati sperimentali indicano che le modificazioni post-trascrizionali degli istoni, quali la metilazione e l'acetilazione, regolano eventi fondamentali come la trascrizione genica e la riparazione del DNA. L'aggiunta di gruppi metilici a specifici residui di lisina e arginina, infatti, non modifica in modo permanente la struttura della cromatina ma crea sul DNA siti di legame per proteine nucleari che agiscono da cofattori trascrizionali (Kouzarides 2003; Stallcup, Kim et al. 2003). D'altro canto, nei mammiferi la metilazione degli istoni è necessaria per il reclutamento di proteine coinvolte nell'arresto del ciclo cellulare e nella riparazione del DNA (Huyen, Zgheib et al. 2004). SUV4-20H1 è certamente coinvolto nel mantenimento della eterocromatina costitutiva (Benetti, Gonzalo et al. 2007); recentemente, però, è stato dimostrato che una diminuzione della sua attività catalitica attenua la trascrizione dei geni indotti dal recettore dei glucocorticoidi (Chinenov, Sacta et al. 2008). L'inibizione della trascrizione del messaggero per SUV4-20H1 indotta da stress termico potrebbe, quindi, modificare il controllo epigenetico del DNA, con conseguenti effetti sulla trascrizione di altri messaggeri, con un meccanismo a catena. Cambiamenti nell'azione degli enzimi ad attività epigenetica, e cioè i regolatori positivi e negativi della acetilazione e i regolatori positivi e negativi della metilazione, sia del DNA che delle proteine ad esso associate, sembrano avere un ruolo nel determinare molti casi di cancro, proprio attraverso la modulazione inappropriata di alcuni geni (Gaetano, Capogrossi et al. 2010). Lo stesso meccanismo potrebbe essere responsabile della teratogenicità evidenziata dallo stress da freddo negli embrioni di *Podarcis*.

○ 8.4.3 Localizzazione molecolare *in situ*

I dati rilevati mostrano che, negli stadi precoci dello sviluppo, il messaggero delle MT si trova concentrato nel sistema nervoso: in particolare, sono positivi all'ibridazione *in situ* le vescicole encefaliche, le aree grigie del midollo allungato e del midollo spinale e la retina. I dati suggeriscono, quindi, che i messaggeri presenti nelle prime fasi dello sviluppo siano di origine materna e che i geni embrionali per le MT si attivino durante lo sviluppo. Questa ipotesi potrebbe essere sostenuta dal dato che nel telencefalo, nel diencefalo e nel mesencefalo si osserva un'assenza di messaggeri nella fase compresa tra i 35 e i 45 giorni. La presenza del messaggero nelle tre vescicole prima della schiusa dimostrerebbe che in queste vescicole i geni embrionali per le MT si sono attivati e che il messaggero è di nuova sintesi. La presenza dell'MT-mRNA nell'encefalo di embrioni suggerisce che il messaggero assolve un ruolo fondamentale nel tessuto cerebrale. Questo dato è supportato da evidenze sperimentali in seguito a studi condotti su specie animali diverse da *Podarcis sicula*; nel tessuto cerebrale umano l'isoforma MT-III è abbondante nel cervello degli individui sani, ma la quantità della proteina è notevolmente ridotta nel cervello di individui affetti dal morbo di Alzheimer (Uchida, Takio et al. 1991); topi che non esprimono tale forma di MT risultano essere più suscettibili a processi neurodegenerativi associati ad epilessia indotta. L'accensione dei geni embrionali è ben evidente negli organi interni: intorno ai 40 giorni, risultano marcati i polmoni e, prima della schiusa, i reni, l'intestino e il fegato. La comparsa del trascritto negli organi interni, inizialmente negativi, dimostra che questi messaggeri sono correlati ad una fase in cui nell'embrione si attiva il metabolismo e l'attività di questi organi.

Responsabili di una importante funzione protettiva verso l'azione tossica dei metalli pesanti, i messaggeri per le MT sono di fondamentale importanza per il corretto funzionamento dei reni, organi detossificatori, e dei polmoni, che sono organi soggetti all'azione di sostanze volatili (Simoniello, Motta et al. 2010).

Il dato che, nel fegato di embrioni prossimi alla schiusa, il trascritto è distribuito nelle cellule di Kupffer è concorde con il fatto che i livelli endogeni di MT presenti normalmente nelle cellule di Kupffer sono nettamente superiori a quelli riscontrati nelle cellule del parenchima (Simoniello, Motta et al. 2010).

Nelle fasi tardive dello sviluppo il messaggero è assente nelle vescicole encefaliche e nell'occhio. L'assenza del messaggero per le MT nelle tre vescicole dell'encefalo è

contemporanea all'inversione di marcatura che si riscontra nel midollo spinale: l'ibridazione in situ mette in evidenza che l'mRNA per le MT è espresso nella sostanza bianca e non nelle cellule della sostanza grigia, in precedenza positive alla reazione.

La presenza di messaggeri per le MT nelle cellule gliali della sostanza bianca del midollo spinale può essere correlata all'importante ruolo che esse hanno di regolare e di mantenere basse le concentrazioni di zinco nello spazio extracellulare del tessuto nervoso. Queste cellule, infatti, sono dotate di un efficiente sistema di canali ionici che consente di eliminare lo zinco dalle regioni prossime alle sinapsi (Lopez, Vurro et al. 2001) e di garantire la necessaria concentrazione di zinco, oligoelemento essenziale per la trasmissione sinaptica (Bryce-Smith 1986) e per la proliferazione cellulare (Hanas, Hazuda et al. 1983). Nell'occhio la presenza dell' MT – mRNA suggerisce che in quest'organo, che è esposto a contaminanti presenti nell'ambiente, il messaggero rappresenta una riserva in grado di fornire in tempi brevi la molecola di difesa (MT) in caso di stress e garantisce alla cellula la presenza di una proteina che, da un lato, svolge una funzione omeostatica nei confronti dei metalli essenziali per la cellula, dall'altro, una funzione protettiva nei confronti dei metalli tossici potenzialmente presenti nell'ambiente.

Per quanto riguarda le *Heat shock protein*, classe di proteine specializzate, sono espresse costitutivamente durante lo sviluppo embrionale, intervenendo nella maturazione e nella localizzazione cellulare delle proteine strutturali e funzionali della cellula; coinvolte nel mantenimento dell'omeostasi cellulare, le HSPs prendono parte a quei processi strettamente correlati alla crescita cellulare, al mantenimento e allo sviluppo.

In particolare HSP70, durante le fasi precoci dello sviluppo, non è presente né a livello del sistema nervoso né a livello degli organi interni: l'encefalo e l'occhio, come pure gli organi interni, sono, infatti, negativi alla reazione. L'assenza del messaggero delle HSPs durante i primi stadi dell'embriogenesi si potrebbe attribuire al fatto che l'mRNA venga bloccato o che venga tradotto molto rapidamente; inoltre, si può formulare l'ipotesi che la stessa proteina sia accumulata dall'ovocita e fa parte del pool di molecole di riserva che, trasferito all'embrione, ne assicura lo sviluppo.

Con il procedere dello sviluppo, negli stadi intermedi, si osserva un netto cambiamento nella presenza e nella distribuzione dell'HSP-mRNA. Il messaggero è distribuito per la prima volta nel telencefalo, nel diencefalo e nel mesencefalo. Sono positivi all'ibridazione il midollo allungato e il midollo spinale. Si osserva marcatura nell'occhio.

La localizzazione del messaggero nell'encefalo e nell'occhio si mantiene pressoché invariata dagli stadi intermedi fino al momento della schiusa.

Indicativa è, invece, la mancata espressione del gene codificante le HSPs nel polmone, nel rene, nel fegato e nell'intestino: il messaggero è, infatti, assente negli organi interni in tutte le fasi dell'embriogenesi. Questi dati si potrebbero correlare a fenomeni di inattivazione genica o ad una rapida traduzione del messaggero con sintesi "de novo" di HSP a livello degli organi interni.

Entrambi i trascritti, MT-e-HSPmRNAs, sono presenti nelle aree studiate ma la localizzazione è la stessa, tanto negli embrioni stressati che in quelli normali, e questo potrebbe spiegare in parte il motivo per cui, a carico delle vescicole encefaliche e dell'occhio, sono evidenti le malformazioni osservate: in mancanza di funzione citoprotettiva, gli effetti teratogeni dello stress non vengono arginati dall'azione delle MT e delle HSPs.

8.5 Conclusioni

Dalle analisi macroscopiche effettuate risulta che gli embrioni di *Danio rerio* esposti ad entrambi gli stimoli stressori (Cd e freddo) durante le fasi di sviluppo precoci mostrano un aumento del tasso di mortalità embrionale, il freddo inoltre provoca negli embrioni che riescono a sopravvivere un notevole rallentamento dello sviluppo stesso.

Di contro, in embrioni in stadi di sviluppo medio-avanzato (24-48 hpf) è noto dalla letteratura che il Cd provoca ipoplasie del capo e degli occhi.

Per ciò che concerne i dati raccolti sullo sviluppo degli embrioni di *Podarcis sicula* sottoposti a stress, dalla letteratura emerge che il cadmio provoca una risposta omogenea in varie fasi dell'embriogenesi andando ad inficiare il corretto sviluppo morfologico delle vescicole cerebrali e degli occhi (Simoniello, Filosa et al. 2010; Simoniello, Motta et al. 2011), che, come appena detto, sono le strutture embrionali più colpite anche in *Danio*. I risultati delle analisi citologiche in microscopia ottica, condotte su embrioni di *Podarcis* in stadio sia precoce (5+5) che tardivo (15+5), hanno mostrato che lo stress termico da basse temperature provoca letalità negli embrioni esposti in una fase di sviluppo precoce; mentre determina malformazioni simili a quelle provocate dal Cd negli embrioni esposti in fase di sviluppo tardiva. Ciò dimostra come la temperatura in questi organismi eterotermi sia un fattore importante, in grado da solo di discriminare tra la vita o la morte degli embrioni nelle fasi precoci di sviluppo, quando

l'organismo è più sensibile. Variazioni di temperatura durante la stagione riproduttiva di questi animali, quindi, possono modificare la fitness riproduttiva e il tasso di sopravvivenza embrionale, mettendo in pericolo la sopravvivenza stessa della specie. Dati preliminari raccolti nel laboratorio dove ho svolto il lavoro di tesi evidenzerebbero come anche leggeri innalzamenti della temperatura di incubazione possano avere effetti letali sugli embrioni, e dimostrerebbero come il *range* ottimale per la temperatura di incubazione sia in realtà molto ristretto. Altro dato interessante evidenziato da questo lavoro di tesi è che agenti teratogeni quale il cadmio e lo stesso freddo inducono alterazioni morfologiche simili nelle vescicole encefaliche e nell'occhio sia in tetrapodi ovipari che in teleostei, dimostrando che queste strutture, indipendentemente dal mezzo in cui avviene lo sviluppo, sono particolarmente sensibili all'effetto di stimoli stressori di natura diversa. Resta comunque da chiarire se i meccanismi con cui agiscono i due diversi fattori stressori sulle cellule sono differenti ma provocano lo stesso tipo di danno oppure, in alternativa, se i fattori stressori diversi agiscono a livello cellulare alterando gli stessi pathway molecolari e determinando quindi le stesse risposte cellulari.

Gli esperimenti di mRNA *Differential Display* riportati in questa tesi hanno permesso di rilevare una variazione dell'espressione genica nelle popolazioni di embrioni trattati sia con cadmio che con freddo rispetto alla popolazione controllo, tale per cui gli effetti teratogeni possono manifestarsi:

- direttamente: modificando l'equilibrio elettrochimico della membrana e agendo su fattori trascrizionali correlati a geni strettamente legati allo sviluppo embrionale;
- indirettamente: causando una serie di meccanismi a catena che regolano attività cellulari e geni fondamentali dell'embriogenesi.

In particolare si evince che in zebrafish il freddo altera, mediante processi inibitori, *pathways* molecolari associati a processi fondamentali per lo sviluppo embrionale, quali:

- Regolazione della trascrizione genica;
- Plasticità neuronale;
- Produzione d'energia e metabolismo cellulare.

A sua volta il cadmio altera processi altrettanto fondamentali per lo sviluppo, quali:

- Regolazione della proliferazione cellulare;
- Regolazione trascrizionale;
- Metabolismo degli acidi grassi.

Infine, sempre mediante analisi di DDRT-PCR condotte su embrioni di lucertola sottoposti a stress termico da basse temperature, si è riscontrata un'inibizione della trascrizione di SUV420H1, un gene codificante una metiltrasferasi coinvolta nella proliferazione cellulare e nello sviluppo.

Confrontando queste informazioni con quelle bibliografiche sugli effetti del cadmio su questi stessi embrioni è possibile trovare delle analogie nei *pathway* molecolari alterati dagli stress nei diversi organismi: nella lucertola, infatti, come in zebrafish, si riscontrano alterazioni a livello:

- della membrana cellulare;
- dei meccanismi di trasduzione del segnale;
- della proliferazione e del differenziamento cellulare;
- della regolazione della trascrizione.

Anche se a questo punto delle indagini non è possibile ipotizzare una correlazione diretta tra l'alterazione stress-indotta di alcuni geni ed eventuali modifiche al normale sviluppo in organismi esposti a stimoli stressori, rimane il fatto che la non corretta regolazione dell'espressione genica di svariate proteine può avere effetti difficilmente prevedibili. Viste le importanti funzioni svolte dalle proteine coinvolte, è evidente che modificazioni nei normali livelli di espressione possono scatenare una serie di reazioni a catena che inevitabilmente si ripercuotono sui meccanismi molecolari fondamentali per il corretto sviluppo embrionale.

- (1993). "Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives." World Health Organization technical report series **837**: 1-53.
- (2007). "Evaluation of certain food additives and contaminants." World Health Organization technical report series(940): 1-92, 91 p following 94.
- (2011). "Evaluation of certain food additives and contaminants." World Health Organization technical report series(966): 1-136.
- Alissa, E. M. and G. A. Ferns (2011). "Heavy metal poisoning and cardiovascular disease." Journal of toxicology **2011**: 870125.
- Amsterdam, A., R. M. Nissen, et al. (2004). "Identification of 315 genes essential for early zebrafish development." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(35): 12792-12797.
- Andrews, G. K. (1990). "Regulation of metallothionein gene expression." Progress in food & nutrition science **14**(2-3): 193-258.
- Ballatori, N. (2002). "Transport of toxic metals by molecular mimicry." Environmental health perspectives **110 Suppl 5**: 689-694.
- Barnes, G. L., Jr., B. D. Mariani, et al. (1996). "Valproic acid-induced somite teratogenesis in the chick embryo: relationship with Pax-1 gene expression." Teratology **54**(2): 93-102.
- Barr, M., Jr. (1973). "The teratogenicity of cadmium chloride in two stocks of Wistar rats." Teratology **7**(3): 237-242.
- Bend, J., M. Bolger, et al. (2007). "Evaluation of certain food additives and contaminants." World Health Organization technical report series(947): 1-225, back cover.
- Benetti, R., S. Gonzalo, et al. (2007). "Suv4-20h deficiency results in telomere elongation and derepression of telomere recombination." The Journal of cell biology **178**(6): 925-936.
- Berleth, T., M. Burri, et al. (1988). "The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the Drosophila embryo." The EMBO journal **7**(6): 1749-1756.
- Bertin, G. and D. Averbeck (2006). "Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review)." Biochimie **88**(11): 1549-1559.
- Blader, P. and U. Strahle (1998). "Ethanol impairs migration of the prechordal plate in the zebrafish embryo." Developmental biology **201**(2): 185-201.
- Braat, A. K., S. van de Water, et al. (2001). "A zebrafish vasa morphant abolishes vasa protein but does not affect the establishment of the germline." Genesis **30**(3): 183-185.
- Bryce-Smith, D. (1986). "Zinc-deficiency: the neglected factor." Nursing Times: 44-46.
- Carginale, V., C. Capasso, et al. (2002). "Identification of cadmium-sensitive genes in the Antarctic fish *Chionodraco hamatus* by messenger RNA differential display." Gene **299**(1-2): 117-124.
- Carson, R., L. Darling, et al. (1962). Silent spring. Boston, Cambridge, Mass., Houghton Mifflin; Riverside Press.
- Carver, J. A., J. A. Aquilina, et al. (1993). "An investigation into the stability of alpha-crystallin by NMR spectroscopy; evidence for a two-domain structure." Biochimica et biophysica acta **1164**(1): 22-28.
- Chan, H. M. and M. G. Cherian (1993). "Ontogenic changes in hepatic metallothionein isoforms in prenatal and newborn rats." Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire **71**(3-4): 133-140.

- Chan, P. K. and S. H. Cheng (2003). "Cadmium-induced ectopic apoptosis in zebrafish embryos." Archives of toxicology **77**(2): 69-79.
- Chibi, M., M. Meyer, et al. (2008). "RBBP6 interacts with multifunctional protein YB-1 through its RING finger domain, leading to ubiquitination and proteosomal degradation of YB-1." Journal of molecular biology **384**(4): 908-916.
- Chinenov, Y., M. A. Sacta, et al. (2008). "GRIP1-associated SET-domain methyltransferase in glucocorticoid receptor target gene expression." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(51): 20185-20190.
- Chiou, H. Y., W. I. Huang, et al. (1997). "Dose-response relationship between prevalence of cerebrovascular disease and ingested inorganic arsenic." Stroke; a journal of cerebral circulation **28**(9): 1717-1723.
- Chisolm, J. J., Jr. (1970). "Poisoning due to heavy metals." Pediatric clinics of North America **17**(3): 591-615.
- Chisolm, J. J., Jr. (1980). "Poisoning from heavy metals (mercury, lead, and cadmium)." Pediatric annals **9**(12): 458-468.
- Chow, E. S., M. N. Hui, et al. (2008). "Cadmium inhibits neurogenesis in zebrafish embryonic brain development." Aquatic toxicology **87**(3): 157-169.
- Chu, B., R. Zhong, et al. (1998). "Transcriptional activity of heat shock factor 1 at 37 degrees C is repressed through phosphorylation on two distinct serine residues by glycogen synthase kinase 3 and protein kinases Calpha and Czeta." The Journal of biological chemistry **273**(29): 18640-18646.
- Ciocca, D. R., S. Oesterreich, et al. (1993). "Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review." Journal of the National Cancer Institute **85**(19): 1558-1570.
- Colosi, G. and B. Baccetti (1967). Zoologia e biologia generale. Torino, Unione tipografico-editrice torinese.
- Corti, C., P. Lo Cascio (1999). "I lacertidi italiani " L'Epos Edizioni. Palermo.
- Costa, M., S. Rosas, et al. (1997). "Expression of heat shock protein 70 and p53 in human lung cancer." Oncology reports **4**(5): 1113-1116.
- Cox, G. F., M. Sourì, et al. (1998). "Reversal of severe hypertrophic cardiomyopathy and excellent neuropsychologic outcome in very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency." The Journal of pediatrics **133**(2): 247-253.
- Curtis, S. L., V. K. Nonavinakere, et al. (1996). "Subacute exposure to cadmium chloride induces HSP-72 in rat liver." Research communications in molecular pathology and pharmacology **94**(2): 221-224.
- Dancis, A., D. S. Yuan, et al. (1994). "Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport." Cell **76**(2): 393-402.
- de Jong, W. W., W. Hendriks, et al. (1989). "Evolution of eye lens crystallins: the stress connection." Trends in biochemical sciences **14**(9): 365-368.
- Deibel, M. A., W. D. Ehmann, et al. (1996). "Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress." Journal of the neurological sciences **143**(1-2): 137-142.
- Duboule, D. (1992). "The vertebrate limb: a model system to study the Hox/HOM gene network during development and evolution." BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology **14**(6): 375-384.

- Dufaure, J. P., J. and Hubert (1966). "Table de développement du lézard vivipara: *Lacerta (Zootoca) vivipara*." Archives D'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale **50**: 307-327.
- Dura Trave, T., M. Puig Abuli, et al. (1984). "Effect of zinc nutrition on parturition and postpartum in the rat." Gynecologic and obstetric investigation **18**(5): 275-280.
- Edgerton, V. R., S. L. Bryant, et al. (1972). "Iron deficiency anemia and physical performance and activity of rats." The Journal of nutrition **102**(3): 381-399.
- Ernest, S., G. J. Rauch, et al. (2000). "Mariner is defective in myosin VIIA: a zebrafish model for human hereditary deafness." Human molecular genetics **9**(14): 2189-2196.
- Evans, T., E. T. Rosenthal, et al. (1983). "Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division." Cell **33**(2): 389-396.
- Fabisiak, J. P., V. A. Tyurin, et al. (1999). "Redox regulation of copper-metallothionein." Archives of biochemistry and biophysics **363**(1): 171-181.
- Fassett, D. W. (1975). "Cadmium: biological effects and occurrence in the environment." Annual review of pharmacology **15**: 425-435.
- Ferm, V. H. (1971). "Developmental malformations induced by cadmium. A study of timed injections during embryogenesis." Biology of the neonate **19**(1): 101-107.
- Ferm, V. H. and S. J. Carpenter (1968). "Malformations induced by sodium arsenate." Journal of reproduction and fertility **17**(1): 199-201.
- Fernandez, E. L., A. L. Gustafson, et al. (2003). "Cadmium-induced changes in apoptotic gene expression levels and DNA damage in mouse embryos are blocked by zinc." Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology **76**(1): 162-170.
- Fimia, G. M., A. Stoykova, et al. (2007). "Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system." Nature **447**(7148): 1121-1125.
- Fraga, C. G. (2005). "Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health." Molecular aspects of medicine **26**(4-5): 235-244.
- Gabor, S., Z. Anca, E. Bordas (1978). "Cadmium-induced lipid peroxidation in kidney and testes. Effect of zinc and copper." Revue Roumaine de Biochimie **15**(2): 113-117.
- Gachot, B. and P. Poujeol (1992). "Effects of cadmium and copper on zinc transport kinetics by isolated renal proximal cells." Biological trace element research **35**(2): 93-103.
- Gaetano, C., M. Capogrossi, et al. (2010). "Epigenetics in rome: Breaking news from the chromatin remodeling and human disease workshop." Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society **5**(3).
- Garcia-Bermejo, L., N. E. Vilaboa, et al. (1997). "Modulation of heat-shock protein 70 (HSP70) gene expression by sodium butyrate in U-937 promonocytic cells: relationships with differentiation and apoptosis." Experimental cell research **236**(1): 268-274.
- Gething, M. J. and J. Sambrook (1992). "Protein folding in the cell." Nature **355**(6355): 33-45.
- Ghoshal, K., Y. Wang, et al. (1998). "Metallothionein induction in response to restraint stress. Transcriptional control, adaptation to stress, and role of glucocorticoid." The Journal of biological chemistry **273**(43): 27904-27910.
- Gilbert, S. F. (2010). Developmental biology. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.
- Gillespie, R. S. and F. M. Wolf (2004). "Intravenous iron therapy in pediatric hemodialysis patients: a meta-analysis." Pediatric nephrology **19**(6): 662-666.
- Giudice, G., G. Sconzo, et al. (1999). "Studies on heat shock proteins in sea urchin development." Development, growth & differentiation **41**(4): 375-380.

- Guettouche, T., F. Boellmann, et al. (2005). "Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress." BMC biochemistry **6**: 4.
- Guven, K., J. A. Duce, et al. (1995). "Calcium moderation of cadmium stress explored using a stress-inducible transgenic strain of *Caenorhabditis elegans*." Comparative biochemistry and physiology. Part C. Pharmacology, toxicology & endocrinology **110**(1): 61-70.
- Haley, D. A., J. Horwitz, et al. (1998). "The small heat-shock protein, alphaB-crystallin, has a variable quaternary structure." Journal of molecular biology **277**(1): 27-35.
- Hamer, D. H. (1986). "Metallothionein." Annual review of biochemistry **55**: 913-951.
- Hanas, J. S., D. J. Hazuda, et al. (1983). "Xenopus transcription factor A requires zinc for binding to the 5 S RNA gene." The Journal of biological chemistry **258**(23): 14120-14125.
- Harmens, H., D. A. Norris, et al. (2010). "Mosses as biomonitors of atmospheric heavy metal deposition: spatial patterns and temporal trends in Europe." Environmental pollution **158**(10): 3144-3156.
- Harris, D. J., E.N. Arnold, R.H. Thomas (1998). "Relationships of lacertid lizards (Reptilia: Lacertidae) estimated from mitochondrial DNA sequences and morphology." Proceedings of the Royal Society - biological sciences **265**(1409): 1939-1948.
- Harris, T. K. and G. J. Turner (2002). "Structural basis of perturbed pKa values of catalytic groups in enzyme active sites." IUBMB life **53**(2): 85-98.
- Hartl, D. L. and A. G. Clark (2007). Principles of population genetics. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.
- Hashimoto, M., P. Bar-On, et al. (2004). "Beta-synuclein regulates Akt activity in neuronal cells. A possible mechanism for neuroprotection in Parkinson's disease." The Journal of biological chemistry **279**(22): 23622-23629.
- Helfman, G. S. (2009). The diversity of fishes : biology, evolution, and ecology. Chichester, UK ; Hoboken, NJ, Blackwell.
- Holland, P. W., H. A. Booth, et al. (2007). "Classification and nomenclature of all human homeobox genes." BMC biology **5**: 47.
- Holt, D. and M. Webb (1987). "Teratogenicity of ionic cadmium in the Wistar rat." Archives of toxicology **59**(6): 443-447.
- Hovland, D. N., Jr., R. M. Cantor, et al. (2000). "Identification of a murine locus conveying susceptibility to cadmium-induced forelimb malformations." Genomics **63**(2): 193-201.
- Hu, H. (2000). "Exposure to metals." Primary care **27**(4): 983-996.
- Huot, J., G. Roy, et al. (1991). "Increased survival after treatments with anticancer agents of Chinese hamster cells expressing the human Mr 27,000 heat shock protein." Cancer research **51**(19): 5245-5252.
- Huyen, Y., O. Zgheib, et al. (2004). "Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks." Nature **432**(7015): 406-411.
- Huynh, K. D. and V. J. Bardwell (1998). "The BCL-6 POZ domain and other POZ domains interact with the co-repressors N-CoR and SMRT." Oncogene **17**(19): 2473-2484.
- Iida, H. (1985). "[Molecular biology of the heat shock proteins]." Seikagaku. The Journal of Japanese Biochemical Society **57**(9): 1282-1289.
- Ikedobi, C. O., V. L. Badisa, et al. (2004). "Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439 normal rat liver cells." International journal of molecular medicine **14**(1): 87-92.

- Ingolia, T. D. and E. A. Craig (1982). "Four small Drosophila heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **79**(7): 2360-2364.
- Jaattela, M. (1999). "Escaping cell death: survival proteins in cancer." Experimental cell research **248**(1): 30-43.
- Jacob, C., W. Maret, et al. (1998). "Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(7): 3489-3494.
- Jakob, U., M. Gaestel, et al. (1993). "Small heat shock proteins are molecular chaperones." The Journal of biological chemistry **268**(3): 1517-1520.
- Jiang, L. J., M. Vasak, et al. (2000). "Zinc transfer potentials of the alpha - and beta-clusters of metallothionein are affected by domain interactions in the whole molecule." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(6): 2503-2508.
- Jin, P. and N. R. Ringertz (1990). "Cadmium induces transcription of proto-oncogenes c-jun and c-myc in rat L6 myoblasts." The Journal of biological chemistry **265**(24): 14061-14064.
- Jin, T., G. F. Nordberg, et al. (1987). "Influence of cadmium-metallothionein pretreatment on tolerance of rat kidney cortical cells to cadmium toxicity in vitro and in vivo." Pharmacology & toxicology **60**(5): 345-349.
- Kagi, J. H. (1991). "Overview of metallothionein." Methods in enzymology **205**: 613-626.
- Kameyama, T. and M. Nagasaka (1983). "Effects of apomorphine and methamphetamine on a quickly-learned conditioned-suppression response in rats." Neuropharmacology **22**(7): 813-817.
- Kamizono, A., M. Nishizawa, et al. (1989). "Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Molecular & general genetics : MGG **219**(1-2): 161-167.
- Kammenga, J. E., M. S. J. Arts, et al. (1998). "HSP60 as a potential biomarker of toxic stress in the nematode *Plectus acuminatus*." Archives of environmental contamination and toxicology **34**(3): 253-258.
- Kane, D. A. and C. B. Kimmel (1993). "The zebrafish midblastula transition." Development **119**(2): 447-456.
- Kappen, C., K. Schughart, et al. (1989). "Two steps in the evolution of Antennapedia-class vertebrate homeobox genes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **86**(14): 5459-5463.
- Kappo, M. A., E. Ab, et al. (2012). "Solution structure of RING finger-like domain of retinoblastoma-binding protein-6 (RBBP6) suggests it functions as a U-box." The Journal of biological chemistry **287**(10): 7146-7158.
- Ketelslegers, H. B., R. W. Gottschalk, et al. (2008). "Multiplex genotyping as a biomarker for susceptibility to carcinogenic exposure in the FLEHS biomonitoring study." Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology **17**(8): 1902-1912.
- Khansakorn, N., W. Wongwit, et al. (2012). "Genetic variations of glutathione s-transferase influence on blood cadmium concentration." Journal of toxicology **2012**: 356126.
- Kim, S. A., J. H. Yoon, et al. (2005). "Polo-like kinase 1 phosphorylates heat shock transcription factor 1 and mediates its nuclear translocation during heat stress." The Journal of biological chemistry **280**(13): 12653-12657.

- Kimmel, C. B. and R. M. Warga (1988). "Cell lineage and developmental potential of cells in the zebrafish embryo." Trends in genetics : TIG **4**(3): 68-74.
- Klaassen, C. D., L. J. Casarett, et al. (2013). Casarett and Doull's toxicology : the basic science of poisons. New York, McGraw-Hill.
- Kline, M. P. and R. I. Morimoto (1997). "Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation." Molecular and cellular biology **17**(4): 2107-2115.
- Koch, K. A., M. M. Pena, et al. (1997). "Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification and signaling." Chemistry & biology **4**(8): 549-560.
- Koedrith, P. and Y. R. Seo (2011). "Advances in carcinogenic metal toxicity and potential molecular markers." International journal of molecular sciences **12**(12): 9576-9595.
- Kouzarides, T. (2003). "Wellcome Trust Award Lecture. Chromatin-modifying enzymes in transcription and cancer." Biochemical Society transactions **31**(Pt 4): 741-743.
- Kulkeaw, K., T. Ishitani, et al. (2010). "Cold exposure down-regulates zebrafish hematopoiesis." Biochemical and biophysical research communications **394**(4): 859-864.
- Kulkeaw, K., T. Ishitani, et al. (2011). "Cold exposure down-regulates zebrafish pigmentation." Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms **16**(4): 358-367.
- Kumar, S. V. and P. A. Wigge (2010). "H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in Arabidopsis." Cell **140**(1): 136-147.
- Laliberte, J. and S. Labbe (2006). "Mechanisms of copper loading on the Schizosaccharomyces pombe copper amine oxidase 1 expressed in Saccharomyces cerevisiae." Microbiology **152**(Pt 9): 2819-2830.
- Lappin, T. R., D. G. Grier, et al. (2006). "HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms." The Ulster medical journal **75**(1): 23-31.
- Lavoie, J. N., E. Hickey, et al. (1993). "Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27." The Journal of biological chemistry **268**(32): 24210-24214.
- Lee, G. J. and E. Vierling (2000). "A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein." Plant physiology **122**(1): 189-198.
- Lee, M. H., M. Kim, et al. (2008). "Subchronic effects of valproic acid on gene expression profiles for lipid metabolism in mouse liver." Toxicology and applied pharmacology **226**(3): 271-284.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson, et al. (2013). Lehninger principles of biochemistry. New York, W.H. Freeman.
- Lenz, W. and K. Knapp (1962). "Thalidomide embryopathy." Archives of environmental health **5**: 100-105.
- Lewin, B. (2004). Genes VIII. Upper Saddle River, N.J., Pearson Prentice Hall.
- Lim, S. O., S. G. Park, et al. (2005). "Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules." World journal of gastroenterology : WJG **11**(14): 2072-2079.
- Lindeman, B., E. Skarpen, et al. (1998). "Stress protein expression in rat liver during tumour promotion: induction of heat-shock protein 27 in hepatocytes exposed to 2-acetylaminofluorene." Carcinogenesis **19**(9): 1559-1563.
- Lopez, A., M. Vurro, et al. (2001). "Role played by a natural channel on the quality of bordering environment: a chemical assessment." Annali di chimica **91**(5-6): 295-304.

- Magnone, M. C., B. Jacobmeier, et al. (2005). "Circadian expression of the clock gene Per2 is altered in the ruin lizard (*Podarcis sicula*) when temperature changes." Brain research. Molecular brain research **133**(2): 281-285.
- Marber, M. S., R. Mestril, et al. (1995). "Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury." The Journal of clinical investigation **95**(4): 1446-1456.
- Marcuccilli, C. J. and R. J. Miller (1994). "CNS stress response: too hot to handle?" Trends in neurosciences **17**(4): 135-138.
- McBride, W. G. (1978). "Teratogenic action of thalidomide." Lancet **1**(8078): 1362.
- McGinnis, W., C. P. Hart, et al. (1984). "Molecular cloning and chromosome mapping of a mouse DNA sequence homologous to homeotic genes of *Drosophila*." Cell **38**(3): 675-680.
- Meistertzheim, A. L., A. Tanguy, et al. (2007). "Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress." The FEBS journal **274**(24): 6392-6402.
- Menke, A., P. Muntner, et al. (2009). "Cadmium levels in urine and mortality among U.S. adults." Environmental health perspectives **117**(2): 190-196.
- Messaoudi, I., J. El Heni, et al. (2009). "Protective effects of selenium, zinc, or their combination on cadmium-induced oxidative stress in rat kidney." Biological trace element research **130**(2): 152-161.
- Messerle, K. and W. S. Webster (1982). "The classification and development of cadmium-induced limb defects in mice." Teratology **25**(1): 61-70.
- Messner, B., M. Knoflach, et al. (2009). "Cadmium is a novel and independent risk factor for early atherosclerosis mechanisms and in vivo relevance." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **29**(9): 1392-1398.
- Minami, Y., J. Hohfeld, et al. (1996). "Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40." The Journal of biological chemistry **271**(32): 19617-19624.
- Moore, K. L. and T. V. N. Persaud (1993). Before we are born : essentials of embryology and birth defects. Philadelphia, Saunders.
- Muchowski, P. J. and J. L. Wacker (2005). "Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones." Nature reviews. Neuroscience **6**(1): 11-22.
- Mukherjee, K., L. Brocchieri, et al. (2009). "A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes." Molecular biology and evolution **26**(12): 2775-2794.
- Multhoff, G. and C. Botzler (1998). "Heat-shock proteins and the immune response." Annals of the New York Academy of Sciences **851**: 86-93.
- Nada, M. A., C. Vianey-Saban, et al. (1996). "Prenatal diagnosis of mitochondrial fatty acid oxidation defects." Prenatal diagnosis **16**(2): 117-124.
- Narayanan, V. and S. Scarlata (2001). "Membrane binding and self-association of alpha-synucleins." Biochemistry **40**(33): 9927-9934.
- Nawrot, T. S., J. A. Staessen, et al. (2010). "Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention." Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine **23**(5): 769-782.
- Newport, J. and M. Kirschner (1982). "A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: II. Control of the onset of transcription." Cell **30**(3): 687-696.

- Noori-Dalooi, M. R., M. Kheirollahi, et al. (2010). "Alpha- and beta-synucleins mRNA expression in lymphocytes of schizophrenia patients." Genetic testing and molecular biomarkers **14**(5): 725-729.
- Nylandsted, J., M. Rohde, et al. (2000). "Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(14): 7871-7876.
- Ohnuma, S. and W. A. Harris (2003). "Neurogenesis and the cell cycle." Neuron **40**(2): 199-208.
- Padmanabhan, R. and M. S. Hameed (1990). "Characteristics of the limb malformations induced by maternal exposure to cadmium in the mouse." Reproductive toxicology **4**(4): 291-304.
- Palmiter, R. D. (1998). "The elusive function of metallothioneins." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(15): 8428-8430.
- Palmiter, R. D. and S. D. Findley (1995). "Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc." The EMBO journal **14**(4): 639-649.
- Patel, N. H. (1994). "Developmental evolution: insights from studies of insect segmentation." Science **266**(5185): 581-590.
- Pinhasi-Kimhi, O., D. Michalovitz, et al. (1986). "Specific interaction between the p53 cellular tumour antigen and major heat shock proteins." Nature **320**(6058): 182-184.
- Pirkkala, L., P. Nykanen, et al. (2001). "Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **15**(7): 1118-1131.
- Plowman, M. C., H. Peracha, et al. (1991). "Teratogenicity of cobalt chloride in *Xenopus laevis*, assayed by the FETAX procedure." Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis **11**(2): 83-92.
- Pories, W. J., J. H. Henzel, et al. (1967). "Acceleration of wound healing in man with zinc sulphate given by mouth." Lancet **1**(7482): 121-124.
- Prodromou, C., S. M. Roe, et al. (1997). "Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone." Cell **90**(1): 65-75.
- Quaife, C. J., S. D. Findley, et al. (1994). "Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia." Biochemistry **33**(23): 7250-7259.
- Richards, M. P. (1991). "Purification and quantification of metallothioneins by reversed-phase high-performance liquid chromatography." Methods in enzymology **205**: 217-238.
- Riggio, M., S. Filosa, et al. (2003). "Changes in zinc, copper and metallothionein contents during oocyte growth and early development of the teleost *Danio rerio* (zebrafish)." Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP **135**(2): 191-196.
- Riggio, M., J. Lee, et al. (2002). "High affinity copper transport protein in the lizard *Podarcis sicula*: molecular cloning, functional characterization and expression in somatic tissues, follicular oocytes and eggs." Biochimica et biophysica acta **1576**(1-2): 127-135.
- Ritossa, F. (1996). "Discovery of the heat shock response." Cell stress & chaperones **1**(2): 97-98.
- Rudiger, S., A. Buchberger, et al. (1997). "Interaction of Hsp70 chaperones with substrates." Nature structural biology **4**(5): 342-349.
- Russnak, R. H. and E. P. Candido (1985). "Locus encoding a family of small heat shock genes in *Caenorhabditis elegans*: two genes duplicated to form a 3.8-kilobase inverted repeat." Molecular and cellular biology **5**(6): 1268-1278.

- Sainio, E. L., R. Jolanki, et al. (2000). "Metals and arsenic in eye shadows." Contact dermatitis **42**(1): 5-10.
- Samson, S. L. and L. Gedamu (1998). "Molecular analyses of metallothionein gene regulation." Progress in nucleic acid research and molecular biology **59**: 257-288.
- Sax, C. M. and J. Piatigorsky (1994). "Expression of the alpha-crystallin/small heat-shock protein/molecular chaperone genes in the lens and other tissues." Advances in enzymology and related areas of molecular biology **69**: 155-201.
- Schmitt, E., L. Maingret, et al. (2006). "Heat shock protein 70 neutralization exerts potent antitumor effects in animal models of colon cancer and melanoma." Cancer research **66**(8): 4191-4197.
- Schroder, H. C., H. M. Hassanein, et al. (1999). "Induction of DNA strand breaks and expression of HSP70 and GRP78 homolog by cadmium in the marine sponge *Suberites domuncula*." Archives of environmental contamination and toxicology **36**(1): 47-55.
- Scott, M. P. and A. J. Weiner (1984). "Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **81**(13): 4115-4119.
- Scudiero, R., P. A. Temussi, et al. (2005). "Fish and mammalian metallothioneins: a comparative study." Gene **345**(1): 21-26.
- Shapira, Y. A., D. Patz, et al. (1984). "Low serum 24,25 dihydroxyvitamin D in Duchenne muscular dystrophy." Neurology **34**(9): 1192-1196.
- Shi, Y., D. D. Mosser, et al. (1998). "Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors." Genes & development **12**(5): 654-666.
- Shine, R. (2005). "Life-history evolution in reptiles." Annual Review of Ecology Evolution and Systematics **36**: 23-46.
- Shorter, J. and S. Lindquist (2004). "Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers." Science **304**(5678): 1793-1797.
- Shu, L., W. Yan, et al. (2006). "RNPC1, an RNA-binding protein and a target of the p53 family, is required for maintaining the stability of the basal and stress-induced p21 transcript." Genes & development **20**(21): 2961-2972.
- Shworak, N. W., T. O'Connor, et al. (1993). "Distinct TATA motifs regulate differential expression of human metallothionein I genes MT-IF and MT-IG." The Journal of biological chemistry **268**(32): 24460-24466.
- Simoniello, P., S. Filosa, et al. (2010). "Responses to cadmium intoxication in the liver of the wall lizard *Podarcis sicula*." Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP **151**(2): 194-203.
- Simoniello, P., C. M. Motta, et al. (2010). "Spatiotemporal changes in metallothionein gene expression during embryogenesis in the wall lizard *Podarcis sicula*." Journal of experimental zoology. Part A, Ecological genetics and physiology **313**(7): 410-420.
- Simoniello, P., C. M. Motta, et al. (2011). "Cadmium-induced teratogenicity in lizard embryos: correlation with metallothionein gene expression." Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP **153**(1): 119-127.
- Simovich, M. J., M. E. Conrad, et al. (2002). "Cellular location of proteins related to iron absorption and transport." American journal of hematology **69**(3): 164-170.
- Soumilion, A., J. Van Damme, et al. (1992). "Cloning and specific polymerised-chain-reaction amplification of a third charge-separable human metallothionein isoform." European journal of biochemistry / FEBS **209**(3): 999-1004.

- Spadaro, J. V. and A. Rabl (2004). "Pathway analysis for population-total health impacts of toxic metal emissions." Risk analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis **24**(5): 1121-1141.
- Stallcup, M. R., J. H. Kim, et al. (2003). "The roles of protein-protein interactions and protein methylation in transcriptional activation by nuclear receptors and their coactivators." The Journal of steroid biochemistry and molecular biology **85**(2-5): 139-145.
- Stohs, S. J., D. Bagchi, et al. (2000). "Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions." Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer **19**(3): 201-213.
- Strange, R. C., P. W. Jones, et al. (2000). "Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology." Toxicology letters **112-113**: 357-363.
- Sunderman, F. W., Jr., M. C. Plowman, et al. (1992). "Teratogenicity of cadmium chloride in the South African frog, *Xenopus laevis*." IARC scientific publications(118): 249-256.
- Swenson, K. I., K. M. Farrell, et al. (1986). "The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes." Cell **47**(6): 861-870.
- Takiguchi, M., W. E. Achanzar, et al. (2003). "Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation." Experimental cell research **286**(2): 355-365.
- Tessitori, M., G. Maria, et al. (2007). "Differential display analysis of gene expression in Etrog citron leaves infected by Citrus viroid III." Biochimica et biophysica acta **1769**(4): 228-235.
- Thirumoorthy, N., K. T. Manisenthil Kumar, et al. (2007). "Metallothionein: an overview." World journal of gastroenterology : WJG **13**(7): 993-996.
- Thompson, J. and J. Bannigan (2001). "Effects of cadmium on formation of the ventral body wall in chick embryos and their prevention by zinc pretreatment." Teratology **64**(2): 87-97.
- Trinchella, F., M. Cannetiello, et al. (2010). "Differential gene expression profiles in embryos of the lizard *Podarcis sicula* under in ovo exposure to cadmium." Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP **151**(1): 33-39.
- Trinchella, F., M. Riggio, et al. (2006). "Cadmium distribution and metallothionein expression in lizard tissues following acute and chronic cadmium intoxication." Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP **144**(3): 272-278.
- Uchida, Y., K. Takio, et al. (1991). "The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein." Neuron **7**(2): 337-347.
- Udom, A. O. and F. O. Brady (1980). "Reactivation in vitro of zinc-requiring apo-enzymes by rat liver zinc-thionein." The Biochemical journal **187**(2): 329-335.
- Underwood, B. A. (1985). "Maternal nutrition, fertility, and reproductive performance in the preindustrialized world." Nutrition update **2**: 207-226.
- Valko, M., H. Morris, et al. (2005). "Metals, toxicity and oxidative stress." Current medicinal chemistry **12**(10): 1161-1208.
- Vallee, B. L. and D. S. Auld (1993). "Cocatalytic zinc motifs in enzyme catalysis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(7): 2715-2718.
- Valles, J. M., Jr., S. R. Wasserman, et al. (2002). "Processes that occur before second cleavage determine third cleavage orientation in *Xenopus*." Experimental cell research **274**(1): 112-118.

- Van Montfort, R., C. Slingsby, et al. (2001). "Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones." Advances in protein chemistry **59**: 105-156.
- Vasilou, V. and A. Pappa (2000). "Polymorphisms of human aldehyde dehydrogenases. Consequences for drug metabolism and disease." Pharmacology **61**(3): 192-198.
- Vitale, L., R. Casadei, et al. (2002). "Cysteine and tyrosine-rich 1 (CYR1), a novel unpredicted gene on human chromosome 21 (21q21.2), encodes a cysteine and tyrosine-rich protein and defines a new family of highly conserved vertebrate-specific genes." Gene **290**(1-2): 141-151.
- Vogen, S., T. Gidalevitz, et al. (2002). "Radicicol-sensitive peptide binding to the N-terminal portion of GRP94." The Journal of biological chemistry **277**(43): 40742-40750.
- Wang, X., Q. Wang, et al. (2010). "Correlation between clinicopathology and expression of heat shock protein 72 and glycoprotein 96 in human esophageal squamous cell carcinoma." Clinical & developmental immunology **2010**: 212537.
- Warga, R. M. and C. B. Kimmel (1990). "Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish." Development **108**(4): 569-580.
- Webster, W. S. and K. Messerle (1980). "Changes in the mouse neuroepithelium associated with cadmium-induced neural tube defects." Teratology **21**(1): 79-88.
- Wegner, R. (2002). "[Poisoning due to heavy metals and arsenic]." Der Internist **43**(7): 818, 821-817.
- Wei, Y. Q., X. Zhao, et al. (1995). "Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (HSP) 70 expression in tumor cells." Cancer immunology, immunotherapy: CII **40**(2): 73-78.
- Wen, Y. D., V. Perissi, et al. (2000). "The histone deacetylase-3 complex contains nuclear receptor corepressors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(13): 7202-7207.
- West, G. B., J. H. Brown, et al. (1997). "A general model for the origin of allometric scaling laws in biology." Science **276**(5309): 122-126.
- West, G. B., J. H. Brown, et al. (2001). "A general model for ontogenetic growth." Nature **413**(6856): 628-631.
- Wistow, G. (1985). "Domain structure and evolution in alpha-crystallins and small heat-shock proteins." FEBS letters **181**(1): 1-6.
- Woolf, A. D. and N. T. Woolf (2005). "Childhood lead poisoning in 2 families associated with spices used in food preparation." Pediatrics **116**(2): e314-318.
- Wu, W. and M. J. Welsh (1996). "Expression of the 25-kDa heat-shock protein (HSP27) correlates with resistance to the toxicity of cadmium chloride, mercuric chloride, cis-platinum(II)-diammine dichloride, or sodium arsenite in mouse embryonic stem cells transfected with sense or antisense HSP27 cDNA." Toxicology and applied pharmacology **141**(1): 330-339.
- Yang, H., J. J. Pesavento, et al. (2008). "Preferential dimethylation of histone H4 lysine 20 by Suv4-20." The Journal of biological chemistry **283**(18): 12085-12092.
- Yoshida, H., Y. Y. Kong, et al. (1998). "Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development." Cell **94**(6): 739-750.
- Young, J. C. and F. U. Hartl (2002). "Chaperones and transcriptional regulation by nuclear receptors." Nature structural biology **9**(9): 640-642.
- ZFIN. from <http://zfin.org/action/marker/view/ZDB-GENE-040426-2356>.

- Zhang, W. L., X. Q. Gao, et al. (2009). "[Expressions of heat shock protein (HSP) family HSP 60, 70 and 90alpha in colorectal cancer tissues and their correlations to pathohistological characteristics]." Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer **28**(6): 612-618.
- Zhong, T. P., S. Childs, et al. (2001). "Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery." Nature **414**(6860): 216-220.
- (1993). "Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives." World Health Organization technical report series **837**: 1-53.
- (2007). "Evaluation of certain food additives and contaminants." World Health Organization technical report series(940): 1-92, 91 p following 94.
- (2011). "Evaluation of certain food additives and contaminants." World Health Organization technical report series(966): 1-136.
- Alissa, E. M. and G. A. Ferns (2011). "Heavy metal poisoning and cardiovascular disease." Journal of toxicology **2011**: 870125.
- Amsterdam, A., R. M. Nissen, et al. (2004). "Identification of 315 genes essential for early zebrafish development." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(35): 12792-12797.
- Andrews, G. K. (1990). "Regulation of metallothionein gene expression." Progress in food & nutrition science **14**(2-3): 193-258.
- Ballatori, N. (2002). "Transport of toxic metals by molecular mimicry." Environmental health perspectives **110 Suppl 5**: 689-694.
- Barnes, G. L., Jr., B. D. Mariani, et al. (1996). "Valproic acid-induced somite teratogenesis in the chick embryo: relationship with Pax-1 gene expression." Teratology **54**(2): 93-102.
- Barr, M., Jr. (1973). "The teratogenicity of cadmium chloride in two stocks of Wistar rats." Teratology **7**(3): 237-242.
- Bend, J., M. Bolger, et al. (2007). "Evaluation of certain food additives and contaminants." World Health Organization technical report series(947): 1-225, back cover.
- Benetti, R., S. Gonzalo, et al. (2007). "Suv4-20h deficiency results in telomere elongation and derepression of telomere recombination." The Journal of cell biology **178**(6): 925-936.
- Berleth, T., M. Burri, et al. (1988). "The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the Drosophila embryo." The EMBO journal **7**(6): 1749-1756.
- Bertin, G. and D. Averbeck (2006). "Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review)." Biochimie **88**(11): 1549-1559.
- Blader, P. and U. Strahle (1998). "Ethanol impairs migration of the prechordal plate in the zebrafish embryo." Developmental biology **201**(2): 185-201.
- Braat, A. K., S. van de Water, et al. (2001). "A zebrafish vasa morphant abolishes vasa protein but does not affect the establishment of the germline." Genesis **30**(3): 183-185.
- Bryce-Smith, D. (1986). "Zinc-deficiency: the neglected factor." Nursing Times: 44-46.
- Carginale, V., C. Capasso, et al. (2002). "Identification of cadmium-sensitive genes in the Antarctic fish Chionodraco hamatus by messenger RNA differential display." Gene **299**(1-2): 117-124.
- Carson, R., L. Darling, et al. (1962). Silent spring. Boston
- Cambridge, Mass., Houghton Mifflin ;
- Riverside Press.
- Carver, J. A., J. A. Aquilina, et al. (1993). "An investigation into the stability of alpha-crystallin by NMR spectroscopy; evidence for a two-domain structure." Biochimica et biophysica acta **1164**(1): 22-28.

- Chan, H. M. and M. G. Cherian (1993). "Ontogenic changes in hepatic metallothionein isoforms in prenatal and newborn rats." Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire **71**(3-4): 133-140.
- Chan, P. K. and S. H. Cheng (2003). "Cadmium-induced ectopic apoptosis in zebrafish embryos." Archives of toxicology **77**(2): 69-79.
- Chibi, M., M. Meyer, et al. (2008). "RBBP6 interacts with multifunctional protein YB-1 through its RING finger domain, leading to ubiquitination and proteosomal degradation of YB-1." Journal of molecular biology **384**(4): 908-916.
- Chinenov, Y., M. A. Sacta, et al. (2008). "GRIP1-associated SET-domain methyltransferase in glucocorticoid receptor target gene expression." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(51): 20185-20190.
- Chiou, H. Y., W. I. Huang, et al. (1997). "Dose-response relationship between prevalence of cerebrovascular disease and ingested inorganic arsenic." Stroke; a journal of cerebral circulation **28**(9): 1717-1723.
- Chisolm, J. J., Jr. (1970). "Poisoning due to heavy metals." Pediatric clinics of North America **17**(3): 591-615.
- Chisolm, J. J., Jr. (1980). "Poisoning from heavy metals (mercury, lead, and cadmium)." Pediatric annals **9**(12): 458-468.
- Chow, E. S., M. N. Hui, et al. (2008). "Cadmium inhibits neurogenesis in zebrafish embryonic brain development." Aquatic toxicology **87**(3): 157-169.
- Chu, B., R. Zhong, et al. (1998). "Transcriptional activity of heat shock factor 1 at 37 degrees C is repressed through phosphorylation on two distinct serine residues by glycogen synthase kinase 3 and protein kinases Calpha and Czeta." The Journal of biological chemistry **273**(29): 18640-18646.
- Ciocca, D. R., S. Oesterreich, et al. (1993). "Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review." Journal of the National Cancer Institute **85**(19): 1558-1570.
- Colosi, G. and B. Baccetti (1967). Zoologia e biologia generale. Torino, Unione tipografico-editrice torinese.
- Corti, C., P. Lo Cascio (1999). "I lacertidi italiani " L'Epos Edizioni. Palermo.
- Costa, M., S. Rosas, et al. (1997). "Expression of heat shock protein 70 and p53 in human lung cancer." Oncology reports **4**(5): 1113-1116.
- Cox, G. F., M. Souri, et al. (1998). "Reversal of severe hypertrophic cardiomyopathy and excellent neuropsychologic outcome in very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency." The Journal of pediatrics **133**(2): 247-253.
- Curtis, S. L., V. K. Nonavinakere, et al. (1996). "Subacute exposure to cadmium chloride induces HSP-72 in rat liver." Research communications in molecular pathology and pharmacology **94**(2): 221-224.
- Dancis, A., D. S. Yuan, et al. (1994). "Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport." Cell **76**(2): 393-402.
- de Jong, W. W., W. Hendriks, et al. (1989). "Evolution of eye lens crystallins: the stress connection." Trends in biochemical sciences **14**(9): 365-368.
- Deibel, M. A., W. D. Ehmann, et al. (1996). "Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress." Journal of the neurological sciences **143**(1-2): 137-142.
- Duboule, D. (1992). "The vertebrate limb: a model system to study the Hox/HOM gene network during development and evolution." BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology **14**(6): 375-384.
- Dufaure, J. P., J. and Hubert (1966). "Table de développement du lézard vivipara: *Lacerta* (*Zootoca*) vivipara." Archives D'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale **50**: 307-327.
- Dura Trave, T., M. Puig Abuli, et al. (1984). "Effect of zinc nutrition on parturition and postpartum in the rat." Gynecologic and obstetric investigation **18**(5): 275-280.

- Edgerton, V. R., S. L. Bryant, et al. (1972). "Iron deficiency anemia and physical performance and activity of rats." The Journal of nutrition **102**(3): 381-399.
- Ernest, S., G. J. Rauch, et al. (2000). "Mariner is defective in myosin VIIA: a zebrafish model for human hereditary deafness." Human molecular genetics **9**(14): 2189-2196.
- Evans, T., E. T. Rosenthal, et al. (1983). "Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division." Cell **33**(2): 389-396.
- Fabisiak, J. P., V. A. Tyurin, et al. (1999). "Redox regulation of copper-metalllothionein." Archives of biochemistry and biophysics **363**(1): 171-181.
- Fassett, D. W. (1975). "Cadmium: biological effects and occurrence in the environment." Annual review of pharmacology **15**: 425-435.
- Ferm, V. H. (1971). "Developmental malformations induced by cadmium. A study of timed injections during embryogenesis." Biology of the neonate **19**(1): 101-107.
- Ferm, V. H. and S. J. Carpenter (1968). "Malformations induced by sodium arsenate." Journal of reproduction and fertility **17**(1): 199-201.
- Fernandez, E. L., A. L. Gustafson, et al. (2003). "Cadmium-induced changes in apoptotic gene expression levels and DNA damage in mouse embryos are blocked by zinc." Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology **76**(1): 162-170.
- Fimia, G. M., A. Stoykova, et al. (2007). "Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system." Nature **447**(7148): 1121-1125.
- Fraga, C. G. (2005). "Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health." Molecular aspects of medicine **26**(4-5): 235-244.
- Gabor, S., Z. Anca, E. Bordas (1978). "Cadmium-induced lipid peroxidation in kidney and testes. Effect of zinc and copper." Revue Roumaine de Biochimie **15**(2): 113-117.
- Gachot, B. and P. Poujeol (1992). "Effects of cadmium and copper on zinc transport kinetics by isolated renal proximal cells." Biological trace element research **35**(2): 93-103.
- Gaetano, C., M. Capogrossi, et al. (2010). "Epigenetics in rome: Breaking news from the chromatin remodeling and human disease workshop." Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society **5**(3).
- Garcia-Bermejo, L., N. E. Vilaboa, et al. (1997). "Modulation of heat-shock protein 70 (HSP70) gene expression by sodium butyrate in U-937 promonocytic cells: relationships with differentiation and apoptosis." Experimental cell research **236**(1): 268-274.
- Gething, M. J. and J. Sambrook (1992). "Protein folding in the cell." Nature **355**(6355): 33-45.
- Ghoshal, K., Y. Wang, et al. (1998). "Metallothionein induction in response to restraint stress. Transcriptional control, adaptation to stress, and role of glucocorticoid." The Journal of biological chemistry **273**(43): 27904-27910.
- Gilbert, S. F. (2010). Developmental biology. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.
- Gillespie, R. S. and F. M. Wolf (2004). "Intravenous iron therapy in pediatric hemodialysis patients: a meta-analysis." Pediatric nephrology **19**(6): 662-666.
- Giudice, G., G. Sconzo, et al. (1999). "Studies on heat shock proteins in sea urchin development." Development, growth & differentiation **41**(4): 375-380.
- Guettouche, T., F. Boellmann, et al. (2005). "Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress." BMC biochemistry **6**: 4.
- Guyen, K., J. A. Duce, et al. (1995). "Calcium moderation of cadmium stress explored using a stress-inducible transgenic strain of *Caenorhabditis elegans*." Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology **110**(1): 61-70.
- Haley, D. A., J. Horwitz, et al. (1998). "The small heat-shock protein, alphaB-crystallin, has a variable quaternary structure." Journal of molecular biology **277**(1): 27-35.
- Hamer, D. H. (1986). "Metallothionein." Annual review of biochemistry **55**: 913-951.
- Hanas, J. S., D. J. Hazuda, et al. (1983). "Xenopus transcription factor A requires zinc for binding to the 5 S RNA gene." The Journal of biological chemistry **258**(23): 14120-14125.
- Harmens, H., D. A. Norris, et al. (2010). "Mosses as biomonitors of atmospheric heavy metal deposition: spatial patterns and temporal trends in Europe." Environmental pollution **158**(10): 3144-3156.

- Harris, D. J., E.N. Arnold, R.H. Thomas (1998). "Relationships of lacertid lizards (Reptilia: Lacertidae) estimated from mitochondrial DNA sequences and morphology." Proceedings of the Royal Society - biological sciences **265(1409)**: 1939–1948.
- Harris, T. K. and G. J. Turner (2002). "Structural basis of perturbed pKa values of catalytic groups in enzyme active sites." IUBMB life **53(2)**: 85-98.
- Hartl, D. L. and A. G. Clark (2007). Principles of population genetics. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.
- Hashimoto, M., P. Bar-On, et al. (2004). "Beta-synuclein regulates Akt activity in neuronal cells. A possible mechanism for neuroprotection in Parkinson's disease." The Journal of biological chemistry **279(22)**: 23622-23629.
- Helfman, G. S. (2009). The diversity of fishes : biology, evolution, and ecology. Chichester, UK ; Hoboken, NJ, Blackwell.
- Holland, P. W., H. A. Booth, et al. (2007). "Classification and nomenclature of all human homeobox genes." BMC biology **5**: 47.
- Holt, D. and M. Webb (1987). "Teratogenicity of ionic cadmium in the Wistar rat." Archives of toxicology **59(6)**: 443-447.
- Hovland, D. N., Jr., R. M. Cantor, et al. (2000). "Identification of a murine locus conveying susceptibility to cadmium-induced forelimb malformations." Genomics **63(2)**: 193-201.
- Hu, H. (2000). "Exposure to metals." Primary care **27(4)**: 983-996.
- Huot, J., G. Roy, et al. (1991). "Increased survival after treatments with anticancer agents of Chinese hamster cells expressing the human Mr 27,000 heat shock protein." Cancer research **51(19)**: 5245-5252.
- Huyen, Y., O. Zgheib, et al. (2004). "Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks." Nature **432(7015)**: 406-411.
- Huynh, K. D. and V. J. Bardwell (1998). "The BCL-6 POZ domain and other POZ domains interact with the co-repressors N-CoR and SMRT." Oncogene **17(19)**: 2473-2484.
- Iida, H. (1985). "[Molecular biology of the heat shock proteins]." Seikagaku. The Journal of Japanese Biochemical Society **57(9)**: 1282-1289.
- Ikedobi, C. O., V. L. Badisa, et al. (2004). "Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439 normal rat liver cells." International journal of molecular medicine **14(1)**: 87-92.
- Ingolia, T. D. and E. A. Craig (1982). "Four small Drosophila heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **79(7)**: 2360-2364.
- Jaattela, M. (1999). "Escaping cell death: survival proteins in cancer." Experimental cell research **248(1)**: 30-43.
- Jacob, C., W. Maret, et al. (1998). "Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95(7)**: 3489-3494.
- Jakob, U., M. Gaestel, et al. (1993). "Small heat shock proteins are molecular chaperones." The Journal of biological chemistry **268(3)**: 1517-1520.
- Jiang, L. J., M. Vasak, et al. (2000). "Zinc transfer potentials of the alpha - and beta-clusters of metallothionein are affected by domain interactions in the whole molecule." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97(6)**: 2503-2508.
- Jin, P. and N. R. Ringertz (1990). "Cadmium induces transcription of proto-oncogenes c-jun and c-myc in rat L6 myoblasts." The Journal of biological chemistry **265(24)**: 14061-14064.
- Jin, T., G. F. Nordberg, et al. (1987). "Influence of cadmium-metallothionein pretreatment on tolerance of rat kidney cortical cells to cadmium toxicity in vitro and in vivo." Pharmacology & toxicology **60(5)**: 345-349.
- Kagi, J. H. (1991). "Overview of metallothionein." Methods in enzymology **205**: 613-626.
- Kameyama, T. and M. Nagasaka (1983). "Effects of apomorphine and methamphetamine on a quickly-learned conditioned-suppression response in rats." Neuropharmacology **22(7)**: 813-817.

- Kamizono, A., M. Nishizawa, et al. (1989). "Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Molecular & general genetics : MGG **219**(1-2): 161-167.
- Kammenga, J. E., M. S. J. Arts, et al. (1998). "HSP60 as a potential biomarker of toxic stress in the nematode *Plectus acuminatus*." Archives of environmental contamination and toxicology **34**(3): 253-258.
- Kane, D. A. and C. B. Kimmel (1993). "The zebrafish midblastula transition." Development **119**(2): 447-456.
- Kappen, C., K. Schughart, et al. (1989). "Two steps in the evolution of Antennapedia-class vertebrate homeobox genes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **86**(14): 5459-5463.
- Kappo, M. A., E. Ab, et al. (2012). "Solution structure of RING finger-like domain of retinoblastoma-binding protein-6 (RBBP6) suggests it functions as a U-box." The Journal of biological chemistry **287**(10): 7146-7158.
- Ketelslegers, H. B., R. W. Gottschalk, et al. (2008). "Multiplex genotyping as a biomarker for susceptibility to carcinogenic exposure in the FLEHS biomonitoring study." Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology **17**(8): 1902-1912.
- Khansakorn, N., W. Wongwit, et al. (2012). "Genetic variations of glutathione s-transferase influence on blood cadmium concentration." Journal of toxicology **2012**: 356126.
- Kim, S. A., J. H. Yoon, et al. (2005). "Polo-like kinase 1 phosphorylates heat shock transcription factor 1 and mediates its nuclear translocation during heat stress." The Journal of biological chemistry **280**(13): 12653-12657.
- Kimmel, C. B. and R. M. Warga (1988). "Cell lineage and developmental potential of cells in the zebrafish embryo." Trends in genetics : TIG **4**(3): 68-74.
- Klaassen, C. D., L. J. Casarett, et al. (2013). Casarett and Doull's toxicology : the basic science of poisons. New York, McGraw-Hill.
- Kline, M. P. and R. I. Morimoto (1997). "Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation." Molecular and cellular biology **17**(4): 2107-2115.
- Koch, K. A., M. M. Pena, et al. (1997). "Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification and signaling." Chemistry & biology **4**(8): 549-560.
- Koedrich, P. and Y. R. Seo (2011). "Advances in carcinogenic metal toxicity and potential molecular markers." International journal of molecular sciences **12**(12): 9576-9595.
- Kouzarides, T. (2003). "Wellcome Trust Award Lecture. Chromatin-modifying enzymes in transcription and cancer." Biochemical Society transactions **31**(Pt 4): 741-743.
- Kulkeaw, K., T. Ishitani, et al. (2010). "Cold exposure down-regulates zebrafish hematopoiesis." Biochemical and biophysical research communications **394**(4): 859-864.
- Kulkeaw, K., T. Ishitani, et al. (2011). "Cold exposure down-regulates zebrafish pigmentation." Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms **16**(4): 358-367.
- Kumar, S. V. and P. A. Wigge (2010). "H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*." Cell **140**(1): 136-147.
- Laliberte, J. and S. Labbe (2006). "Mechanisms of copper loading on the *Schizosaccharomyces pombe* copper amine oxidase 1 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiology **152**(Pt 9): 2819-2830.
- Lappin, T. R., D. G. Grier, et al. (2006). "HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms." The Ulster medical journal **75**(1): 23-31.
- Lavoie, J. N., E. Hickey, et al. (1993). "Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27." The Journal of biological chemistry **268**(32): 24210-24214.
- Lee, G. J. and E. Vierling (2000). "A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein." Plant physiology **122**(1): 189-198.

- Lee, M. H., M. Kim, et al. (2008). "Subchronic effects of valproic acid on gene expression profiles for lipid metabolism in mouse liver." Toxicology and applied pharmacology **226**(3): 271-284.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson, et al. (2013). Lehninger principles of biochemistry. New York, W.H. Freeman.
- Lenz, W. and K. Knapp (1962). "Thalidomide embryopathy." Archives of environmental health **5**: 100-105.
- Lewin, B. (2004). Genes VIII. Upper Saddle River, N.J., Pearson Prentice Hall.
- Liang, P. and A. B. Pardee (1992). "Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction." Science **257**(5072): 967-971.
- Lim, S. O., S. G. Park, et al. (2005). "Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules." World journal of gastroenterology : WJG **11**(14): 2072-2079.
- Lindeman, B., E. Skarpen, et al. (1998). "Stress protein expression in rat liver during tumour promotion: induction of heat-shock protein 27 in hepatocytes exposed to 2-acetylaminofluorene." Carcinogenesis **19**(9): 1559-1563.
- Lopez, A., M. Vurro, et al. (2001). "Role played by a natural channel on the quality of bordering environment: a chemical assessment." Annali di chimica **91**(5-6): 295-304.
- Magnone, M. C., B. Jacobmeier, et al. (2005). "Circadian expression of the clock gene Per2 is altered in the ruin lizard (*Podarcis sicula*) when temperature changes." Brain research. Molecular brain research **133**(2): 281-285.
- Marber, M. S., R. Mestrl, et al. (1995). "Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury." The Journal of clinical investigation **95**(4): 1446-1456.
- Marcuccilli, C. J. and R. J. Miller (1994). "CNS stress response: too hot to handle?" Trends in neurosciences **17**(4): 135-138.
- McBride, W. G. (1978). "Teratogenic action of thalidomide." Lancet **1**(8078): 1362.
- McGinnis, W., C. P. Hart, et al. (1984). "Molecular cloning and chromosome mapping of a mouse DNA sequence homologous to homeotic genes of *Drosophila*." Cell **38**(3): 675-680.
- Meistertzheim, A. L., A. Tanguy, et al. (2007). "Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress." The FEBS journal **274**(24): 6392-6402.
- Menke, A., P. Muntner, et al. (2009). "Cadmium levels in urine and mortality among U.S. adults." Environmental health perspectives **117**(2): 190-196.
- Messaoudi, I., J. El Heni, et al. (2009). "Protective effects of selenium, zinc, or their combination on cadmium-induced oxidative stress in rat kidney." Biological trace element research **130**(2): 152-161.
- Messerle, K. and W. S. Webster (1982). "The classification and development of cadmium-induced limb defects in mice." Teratology **25**(1): 61-70.
- Messner, B., M. Knoflach, et al. (2009). "Cadmium is a novel and independent risk factor for early atherosclerosis mechanisms and in vivo relevance." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **29**(9): 1392-1398.
- Minami, Y., J. Hohfeld, et al. (1996). "Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40." The Journal of biological chemistry **271**(32): 19617-19624.
- Moore, K. L. and T. V. N. Persaud (1993). Before we are born : essentials of embryology and birth defects. Philadelphia, Saunders.
- Muchowski, P. J. and J. L. Wacker (2005). "Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones." Nature reviews. Neuroscience **6**(1): 11-22.
- Mukherjee, K., L. Brocchieri, et al. (2009). "A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes." Molecular biology and evolution **26**(12): 2775-2794.
- Multhoff, G. and C. Botzler (1998). "Heat-shock proteins and the immune response." Annals of the New York Academy of Sciences **851**: 86-93.

- Nada, M. A., C. Vianey-Saban, et al. (1996). "Prenatal diagnosis of mitochondrial fatty acid oxidation defects." Prenatal diagnosis **16**(2): 117-124.
- Narayanan, V. and S. Scarlata (2001). "Membrane binding and self-association of alpha-synucleins." Biochemistry **40**(33): 9927-9934.
- Nawrot, T. S., J. A. Staessen, et al. (2010). "Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention." Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine **23**(5): 769-782.
- Newport, J. and M. Kirschner (1982). "A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: II. Control of the onset of transcription." Cell **30**(3): 687-696.
- Noori-Dalooi, M. R., M. Kheirollahi, et al. (2010). "Alpha- and beta-synucleins mRNA expression in lymphocytes of schizophrenia patients." Genetic testing and molecular biomarkers **14**(5): 725-729.
- Nylandsted, J., M. Rohde, et al. (2000). "Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(14): 7871-7876.
- Ohnuma, S. and W. A. Harris (2003). "Neurogenesis and the cell cycle." Neuron **40**(2): 199-208.
- Padmanabhan, R. and M. S. Hameed (1990). "Characteristics of the limb malformations induced by maternal exposure to cadmium in the mouse." Reproductive toxicology **4**(4): 291-304.
- Palmiter, R. D. (1998). "The elusive function of metallothioneins." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(15): 8428-8430.
- Palmiter, R. D. and S. D. Findley (1995). "Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc." The EMBO journal **14**(4): 639-649.
- Patel, N. H. (1994). "Developmental evolution: insights from studies of insect segmentation." Science **266**(5185): 581-590.
- Pinhasi-Kimhi, O., D. Michalovitz, et al. (1986). "Specific interaction between the p53 cellular tumour antigen and major heat shock proteins." Nature **320**(6058): 182-184.
- Pirkkala, L., P. Nykanen, et al. (2001). "Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **15**(7): 1118-1131.
- Plowman, M. C., H. Peracha, et al. (1991). "Teratogenicity of cobalt chloride in *Xenopus laevis*, assayed by the FETAX procedure." Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis **11**(2): 83-92.
- Pories, W. J., J. H. Henzel, et al. (1967). "Acceleration of wound healing in man with zinc sulphate given by mouth." Lancet **1**(7482): 121-124.
- Prodromou, C., S. M. Roe, et al. (1997). "Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone." Cell **90**(1): 65-75.
- Quaife, C. J., S. D. Findley, et al. (1994). "Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia." Biochemistry **33**(23): 7250-7259.
- Richards, M. P. (1991). "Purification and quantification of metallothioneins by reversed-phase high-performance liquid chromatography." Methods in enzymology **205**: 217-238.
- Riggio, M., S. Filosa, et al. (2003). "Changes in zinc, copper and metallothionein contents during oocyte growth and early development of the teleost *Danio rerio* (zebrafish)." Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP **135**(2): 191-196.
- Riggio, M., J. Lee, et al. (2002). "High affinity copper transport protein in the lizard *Podarcis sicula*: molecular cloning, functional characterization and expression in somatic tissues, follicular oocytes and eggs." Biochimica et biophysica acta **1576**(1-2): 127-135.
- Ritossa, F. (1996). "Discovery of the heat shock response." Cell stress & chaperones **1**(2): 97-98.
- Rudiger, S., A. Buchberger, et al. (1997). "Interaction of Hsp70 chaperones with substrates." Nature structural biology **4**(5): 342-349.
- Russnak, R. H. and E. P. Candido (1985). "Locus encoding a family of small heat shock genes in *Caenorhabditis elegans*: two genes duplicated to form a 3.8-kilobase inverted repeat." Molecular and cellular biology **5**(6): 1268-1278.

- Sainio, E. L., R. Jolanki, et al. (2000). "Metals and arsenic in eye shadows." Contact dermatitis **42**(1): 5-10.
- Samson, S. L. and L. Gedamu (1998). "Molecular analyses of metallothionein gene regulation." Progress in nucleic acid research and molecular biology **59**: 257-288.
- Sanger, T. J., J. B. Losos, et al. (2008). "A developmental staging series for the lizard genus *Anolis*: a new system for the integration of evolution, development, and ecology." Journal of morphology **269**(2): 129-137.
- Sax, C. M. and J. Piatigorsky (1994). "Expression of the alpha-crystallin/small heat-shock protein/molecular chaperone genes in the lens and other tissues." Advances in enzymology and related areas of molecular biology **69**: 155-201.
- Schmitt, E., L. Maingret, et al. (2006). "Heat shock protein 70 neutralization exerts potent antitumor effects in animal models of colon cancer and melanoma." Cancer research **66**(8): 4191-4197.
- Schroder, H. C., H. M. Hassanein, et al. (1999). "Induction of DNA strand breaks and expression of HSP70 and GRP78 homolog by cadmium in the marine sponge *Suberites domuncula*." Archives of environmental contamination and toxicology **36**(1): 47-55.
- Scott, M. P. and A. J. Weiner (1984). "Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the *Antennapedia*, *Ultrabithorax*, and *fushi tarazu* loci of *Drosophila*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **81**(13): 4115-4119.
- Scudiero, R., P. A. Temussi, et al. (2005). "Fish and mammalian metallothioneins: a comparative study." Gene **345**(1): 21-26.
- Shapira, Y. A., D. Patz, et al. (1984). "Low serum 24,25 dihydroxyvitamin D in Duchenne muscular dystrophy." Neurology **34**(9): 1192-1196.
- Shi, Y., D. D. Mosser, et al. (1998). "Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors." Genes & development **12**(5): 654-666.
- Shine, R. (2005). "Life-history evolution in reptiles." Annual Review of Ecology Evolution and Systematics **36**: 23-46.
- Shorter, J. and S. Lindquist (2004). "Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers." Science **304**(5678): 1793-1797.
- Shu, L., W. Yan, et al. (2006). "RNPC1, an RNA-binding protein and a target of the p53 family, is required for maintaining the stability of the basal and stress-induced p21 transcript." Genes & development **20**(21): 2961-2972.
- Shworak, N. W., T. O'Connor, et al. (1993). "Distinct TATA motifs regulate differential expression of human metallothionein I genes MT-IF and MT-IG." The Journal of biological chemistry **268**(32): 24460-24466.
- Simoniello, P., S. Filosa, et al. (2010). "Responses to cadmium intoxication in the liver of the wall lizard *Podarcis sicula*." Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP **151**(2): 194-203.
- Simoniello, P., C. M. Motta, et al. (2010). "Spatiotemporal changes in metallothionein gene expression during embryogenesis in the wall lizard *Podarcis sicula*." Journal of experimental zoology. Part A, Ecological genetics and physiology **313**(7): 410-420.
- Simoniello, P., C. M. Motta, et al. (2011). "Cadmium-induced teratogenicity in lizard embryos: correlation with metallothionein gene expression." Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP **153**(1): 119-127.
- Simovich, M. J., M. E. Conrad, et al. (2002). "Cellular location of proteins related to iron absorption and transport." American journal of hematology **69**(3): 164-170.
- Soumilion, A., J. Van Damme, et al. (1992). "Cloning and specific polymerised-chain-reaction amplification of a third charge-separable human metallothionein isoform." European journal of biochemistry / FEBS **209**(3): 999-1004.
- Spadaro, J. V. and A. Rabl (2004). "Pathway analysis for population-total health impacts of toxic metal emissions." Risk analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis **24**(5): 1121-1141.

- Stallcup, M. R., J. H. Kim, et al. (2003). "The roles of protein-protein interactions and protein methylation in transcriptional activation by nuclear receptors and their coactivators." The Journal of steroid biochemistry and molecular biology **85**(2-5): 139-145.
- Stohs, S. J., D. Bagchi, et al. (2000). "Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions." Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer **19**(3): 201-213.
- Strange, R. C., P. W. Jones, et al. (2000). "Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology." Toxicology letters **112-113**: 357-363.
- Sunderman, F. W., Jr., M. C. Plowman, et al. (1992). "Teratogenicity of cadmium chloride in the South African frog, *Xenopus laevis*." IARC scientific publications(118): 249-256.
- Swenson, K. I., K. M. Farrell, et al. (1986). "The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes." Cell **47**(6): 861-870.
- Takiguchi, M., W. E. Achanzar, et al. (2003). "Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation." Experimental cell research **286**(2): 355-365.
- Tessitori, M., G. Maria, et al. (2007). "Differential display analysis of gene expression in Etrog citron leaves infected by Citrus viroid III." Biochimica et biophysica acta **1769**(4): 228-235.
- Thirumoorthy, N., K. T. Manisenthil Kumar, et al. (2007). "Metallothionein: an overview." World journal of gastroenterology : WJG **13**(7): 993-996.
- Thompson, J. and J. Bannigan (2001). "Effects of cadmium on formation of the ventral body wall in chick embryos and their prevention by zinc pretreatment." Teratology **64**(2): 87-97.
- Trinchella, F., M. Cannetiello, et al. (2010). "Differential gene expression profiles in embryos of the lizard *Podarcis sicula* under in ovo exposure to cadmium." Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP **151**(1): 33-39.
- Trinchella, F., M. Riggio, et al. (2006). "Cadmium distribution and metallothionein expression in lizard tissues following acute and chronic cadmium intoxication." Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP **144**(3): 272-278.
- Uchida, Y., K. Takio, et al. (1991). "The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein." Neuron **7**(2): 337-347.
- Udom, A. O. and F. O. Brady (1980). "Reactivation in vitro of zinc-requiring apo-enzymes by rat liver zinc-thionein." The Biochemical journal **187**(2): 329-335.
- Underwood, B. A. (1985). "Maternal nutrition, fertility, and reproductive performance in the preindustrialized world." Nutrition update **2**: 207-226.
- Valko, M., H. Morris, et al. (2005). "Metals, toxicity and oxidative stress." Current medicinal chemistry **12**(10): 1161-1208.
- Vallee, B. L. and D. S. Auld (1993). "Cocatalytic zinc motifs in enzyme catalysis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(7): 2715-2718.
- Valles, J. M., Jr., S. R. Wasserman, et al. (2002). "Processes that occur before second cleavage determine third cleavage orientation in *Xenopus*." Experimental cell research **274**(1): 112-118.
- Van Montfort, R., C. Slingsby, et al. (2001). "Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones." Advances in protein chemistry **59**: 105-156.
- Vasiliou, V. and A. Pappa (2000). "Polymorphisms of human aldehyde dehydrogenases. Consequences for drug metabolism and disease." Pharmacology **61**(3): 192-198.
- Vitale, L., R. Casadei, et al. (2002). "Cysteine and tyrosine-rich 1 (CYR1), a novel unpredicted gene on human chromosome 21 (21q21.2), encodes a cysteine and tyrosine-rich protein and defines a new family of highly conserved vertebrate-specific genes." Gene **290**(1-2): 141-151.
- Vogen, S., T. Gidalevitz, et al. (2002). "Radical-sensitive peptide binding to the N-terminal portion of GRP94." The Journal of biological chemistry **277**(43): 40742-40750.
- Wang, X., Q. Wang, et al. (2010). "Correlation between clinicopathology and expression of heat shock protein 72 and glycoprotein 96 in human esophageal squamous cell carcinoma." Clinical & developmental immunology **2010**: 212537.

- Warga, R. M. and C. B. Kimmel (1990). "Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish." Development **108**(4): 569-580.
- Webster, W. S. and K. Messerle (1980). "Changes in the mouse neuroepithelium associated with cadmium-induced neural tube defects." Teratology **21**(1): 79-88.
- Wegner, R. (2002). "[Poisoning due to heavy metals and arsenic]." Der Internist **43**(7): 818, 821-817.
- Wei, Y. Q., X. Zhao, et al. (1995). "Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (HSP) 70 expression in tumor cells." Cancer immunology, immunotherapy : CI **40**(2): 73-78.
- Wen, Y. D., V. Perissi, et al. (2000). "The histone deacetylase-3 complex contains nuclear receptor corepressors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(13): 7202-7207.
- West, G. B., J. H. Brown, et al. (1997). "A general model for the origin of allometric scaling laws in biology." Science **276**(5309): 122-126.
- West, G. B., J. H. Brown, et al. (2001). "A general model for ontogenetic growth." Nature **413**(6856): 628-631.
- Wistow, G. (1985). "Domain structure and evolution in alpha-crystallins and small heat-shock proteins." FEBS letters **181**(1): 1-6.
- Woolf, A. D. and N. T. Woolf (2005). "Childhood lead poisoning in 2 families associated with spices used in food preparation." Pediatrics **116**(2): e314-318.
- Wu, W. and M. J. Welsh (1996). "Expression of the 25-kDa heat-shock protein (HSP27) correlates with resistance to the toxicity of cadmium chloride, mercuric chloride, cis-platinum(II)-diammine dichloride, or sodium arsenite in mouse embryonic stem cells transfected with sense or antisense HSP27 cDNA." Toxicology and applied pharmacology **141**(1): 330-339.
- Yang, H., J. J. Pesavento, et al. (2008). "Preferential dimethylation of histone H4 lysine 20 by Suv4-20." The Journal of biological chemistry **283**(18): 12085-12092.
- Yoshida, H., Y. Y. Kong, et al. (1998). "Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development." Cell **94**(6): 739-750.
- Young, J. C. and F. U. Hartl (2002). "Chaperones and transcriptional regulation by nuclear receptors." Nature structural biology **9**(9): 640-642.
- ZFIN. from <http://zfin.org/action/marker/view/ZDB-GENE-040426-2356>.
- Zhang, W. L., X. Q. Gao, et al. (2009). "[Expressions of heat shock protein (HSP) family HSP 60, 70 and 90alpha in colorectal cancer tissues and their correlations to pathohistological characteristics]." Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer **28**(6): 612-618.
- Zhong, T. P., S. Childs, et al. (2001). "Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery." Nature **414**(6860): 216-220.